

Oberflächenmodifizierung unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Janna Friederike Mengersen
aus Bielefeld

1. Referentin:	Professorin Dr. Heike Bunjes
2. Referentin:	Professorin Dr. Christel Müller-Goymann
eingereicht am:	05.03.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.09.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Mengersen, F. & Bunjes, H.: PEGylation of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81: 409-417 (2012).

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Chemical stability of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82: 262-271 (2012).

Tagungsbeiträge

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Surface modification of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. (Poster) Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Halle an der Saale (2009)

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Surface modification of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. (Poster) Symposium „Phospholipids in Pharmaceutical Research“, Heidelberg (2009)

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Surface modification of preformed supercooled smectic nanoparticles with MPEG₂₀₀₀-DSPE. (Poster) DPhG Jahrestagung, Jena (2009).

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Influence of PEGylation on the properties of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. (Poster) 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta (2010).

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Investigation of the chemical stability of supercooled smectic nanoparticles. (Poster) DPhG Jahrestagung, Braunschweig (2010)

Kuntsche, J. & Sängler, S., Mengersen, F., Bunjes, H.: Analysis of supercooled smectic nanoparticles by asymmetrical flow field-flow fractionation. (Poster) DPhG Jahrestagung, Braunschweig (2010)

Mengersen, F. & Bunjes, H.: Stability of phospholipids in dispersions of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. (Poster) 2nd Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg (2011)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Heike Bunjes am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Heike Bunjes

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. Judith Kuntsche vom Department of Physics, Chemistry and Pharmacy der University of Southern Denmark und Herrn Dr. Hendrik Metz vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich mich für Ihre Unterstützung bei der Durchführung der ESR-Untersuchungen bedanken.

Dr. Kerstin Ibrom und Petra Holba-Schulz vom NMR-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig danke ich für die Durchführungen der NMR-Messungen und Dr. Lutz Preu vom Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die Unterstützung bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Dr. Till Beuerle vom Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Bei der Lipoid GmbH möchte ich mich für die freundliche Überlassung der Phospholipide bedanken.

Silvia Petersen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Einführung in die Herstellung unterkühlt-smektischer Lipidnanopartikel.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für das sehr angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben sowie für die schöne gemeinsame Zeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Jan Henrik Finke, Gesa Maria Grobe, Friederike Kolditz, Alexander Wittneben, Luise Meyer, Jan Krähling, Meike Harms und Mike Mücke für Ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

Zum Abschluss geht mein ganz besonderer Dank an meine Familie und meine Freunde, denen diese Arbeit gewidmet ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	4
2.1	Kolloidale Arzneistoffträgersysteme für die parenterale Applikation	4
2.1.1	Liposomen	5
2.1.2	Kolloidale Lipidemulsionen	5
2.1.3	Feste Lipidnanopartikel	6
2.1.4	Nanostrukturierte Lipidcarrier	7
2.2	Flüssigkristalline Lipidnanopartikel	7
2.2.1	Flüssigkristalline Zustände	7
2.2.2	Lyotrop-flüssigkristalline Nanopartikel	8
2.2.3	Thermotrop-flüssigkristalline Nanopartikel	9
2.2.3.1	Unterkühlt-smektische Cholesterolester-Nanopartikel . . .	10
2.3	Oberflächenmodifikationen an kolloidalen Partikeln	13
2.3.1	Passives und aktives Targeting	13
2.3.1.1	Verlängerung der Zirkulationszeit - PEGylierung	14
2.3.1.2	Aktives Targeting	16
2.3.2	Oberflächenladung	17
2.4	Chemische Stabilität Phospholipid-stabilsierter kolloidaler Trägersysteme .	18
3	Materialien und Methoden	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Matrixlipid	19

3.1.2	Stabilisatoren	20
3.1.2.1	Phospholipide	20
3.1.2.2	Natriumglycocholat	21
3.1.2.3	Poloxamer 188	21
3.1.2.4	DDAB	22
3.1.3	Wasserqualität	22
3.1.4	Weitere Materialien	22
3.2	Methoden	24
3.2.1	Zusammensetzung und Herstellung der Dispersionen	24
3.2.1.1	Zusammensetzung	24
3.2.1.2	Hochdruckhomogenisation	24
3.2.1.3	Herstellung PEGylierter Nanopartikel	26
3.2.1.4	Herstellung positiv geladener Nanopartikel	26
3.2.1.5	Herstellung weiterer Systeme	26
3.2.1.6	Herstellung PEGylierter Partikel mittels nachträglicher PEGylierung	27
3.2.2	Partikelgrößenanalyse mittels Photonenkorrelations- spektroskopie (PCS)	28
3.2.3	Bestimmung des Zetapotentials	28
3.2.4	Dynamische Differenzkalorimetrie	29
3.2.5	Bestimmung des pH-Wertes	29
3.2.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	29
3.2.7	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	30
3.2.8	Massenspektrometrie (MS)	31
3.2.9	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	32
3.2.10	Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie)	33
3.2.10.1	Untersuchung der Verteilung von ESR-Sonden in Lipidna- nodispersionen	33
3.2.10.2	Ascorbinsäure-Reduktionsassay	33
3.2.10.3	Transferuntersuchung	33

4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Direkte PEGylierung unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel	35
4.1.1	Einfluss der PEGylierung auf die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung	36
4.1.2	Einfluss der PEGylierung auf das Zetapotential	38
4.1.3	Einfluss der PEGylierung auf das Phasenverhalten	39
4.1.4	Rekristallisationstendenz während der Lagerung	41
4.1.5	Stabilitätsuntersuchungen unter Stressbedingungen	43
4.1.6	Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie	47
4.2	Stabilität unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel unter besonderer Berücksichtigung der chemischen Stabilität	51
4.2.1	Veränderungen von pH, Zetapotential und Partikelgröße während der Lagerung	51
4.2.2	HPTLC-Analyse von Dispersionen nach Lagerung	55
4.2.3	HPTLC-Analyse von Dispersionen nach Herstellung und Kurzzeit-Lagerung	55
4.2.4	Veränderungen des Phasenverhaltens während der Lagerung	59
4.2.5	HPTLC- und HPLC-Analyse weiterer Zersetzungsprozesse in den Dispersionen	62
4.2.6	Untersuchung des Zersetzungsproduktes von Cholesterylmyristat	63
	4.2.6.1 Lagerung unter Stressbedingungen	63
	4.2.6.2 Massenspektrometrie	65
4.2.7	Schutz der Dispersionen vor Zersetzung	66
4.3	Nachträgliche PEGylierung („ <i>post-insertion</i> “ Methode)	67
4.3.1	Partikelgröße und Polydispersitätsindex	67
4.3.2	Zetapotential	69
4.3.3	Phasenverhalten	70
4.4	Poloxamer-stabilisierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel	73
4.5	Cholesterylmyristat-Nanopartikel mit positiv geladener Oberfläche	76

4.5.1	Partikelgröße und Zetapotential	76
4.5.2	Phasenverhalten	77
4.6	Elektronenspinresonanz-Untersuchungen	78
4.6.1	Elektronenspinresonanz (ESR)	78
4.6.2	Eigenschaften der ESR-Sonden	81
4.6.3	Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der untersuchten Systeme	81
4.6.4	ESR-Untersuchungen an unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln	82
4.6.5	ESR-Untersuchungen an einer Miglyol-Emulsion	85
4.6.6	Ascorbinsäure-Reduktionsassay	86
4.6.7	Transferuntersuchungen mit Lipofundin [®] MCT 20%	88
5	Abschlussdiskussion	92
6	Zusammenfassung	99
	Literaturverzeichnis	102
	Anhang	117

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

Unterkühlt-smektische Lipidnanopartikel wurden als alternatives kolloidales Arzneistoff-Trägersystem zu festen Lipidnanopartikeln und Lipidnanoemulsionen für die parenterale Applikation eingeführt [1], um die vorteilhaften Eigenschaften beider Systeme zu vereinen. Ein Vorteil der kolloidalen Lipidemulsionen ist ihre größere Arzneistoff-Aufnahmekapazität aufgrund des flüssigen Zustandes der Lipidphase im Gegensatz zur hoch geordneten kristallinen Lipidmatrix von festen Lipidnanopartikeln [2]. Dagegen erhofft man sich bei festen Lipidnanopartikeln eine verzögertere oder kontrolliertere Arzneistoff-Freisetzung [3, 4] als bei Emulsionen [5, 6]. Bei dem unterkühlt-smektischen Zustand handelt es sich um eine thermotrop-flüssigkristalline Phase, in der das Matrixlipid eine hohe Viskosität aufweist, aber eine geringere Ordnung auf molekularer Ebene als im kristallinen Zustand. Diese Eigenschaften könnten einen Kompromiss hinsichtlich der Immobilisierung von Arzneistoffen und der Arzneistoff-Beladungskapazität darstellen. Die unterkühlt-smektischen Nanopartikel basieren auf Cholesterolestern (z.B. Cholesterylmyristat) und können mittels Schmelz-Hochdruckhomogenisation in Anwesenheit von Emulgatoren (z.B. Phospholipiden) hergestellt werden. Bei Verwendung geeigneter Stabilisatoren und Lagerbedingungen kann eine Langzeit-Stabilität des metastabilen smektischen Zustandes der Partikel erreicht werden [7].

Im Hinblick auf die intravenöse Applikation solcher Dispersionen sind die Partikelgröße und die physikochemischen Eigenschaften der Partikeloberfläche wichtige Faktoren, die die Zirkulationszeit im Blutkreislauf bestimmen. Unmodifizierte Partikel werden in der Regel nach der intravenösen Applikation schnell durch das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) entfernt [8]. Aus diesem Grund gibt es mittlerweile viele Ansätze, die durch Modifizierung der Partikeloberfläche eine „Abschirmung“ der Partikel erzielen wollen, um damit eine zu schnelle Eliminierung der Partikel zu verhindern. Es ist bekannt, dass z.B. durch PEGylierung die Zirkulationszeit von kolloidalen Trägersystemen im Blut

verlängert werden kann [9, 10]. Man spricht von PEGylierung, wenn die Oberfläche mit Polyethylenglykol (PEG)-Ketten modifiziert wird. Häufig werden zur Verlängerung der Zirkulationszeit PEGylierte Phospholipide eingesetzt [11, 12].

Da es bei thermotrop-flüssigkristallinen Lipidnanopartikeln bisher keine Untersuchungen zur PEGylierung gibt, war ein Hauptziel dieser Arbeit, PEGylierte unterkühlt-smektische Lipidnanopartikel durch die Verwendung von MPEG₂₀₀₀-DSPE zu entwickeln und den Nachweis für eine erfolgreiche PEGylierung der Partikel zu erbringen. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, wie die PEGylierung nachgewiesen werden kann. Gibt es eine direkte Nachweismethode oder ist es auch möglich auf indirektem Wege die PEGylierung zu beweisen? Um die PEGylierung indirekt nachzuweisen, wurde überlegt, welche Effekte die PEGylierung auf bestimmte Partikeleigenschaften haben könnte und ob es möglich ist, diese zu detektieren. Die PEG-Ketten müssten die Oberflächenladung der Partikel abschirmen, so dass es zu einer Abnahme des Zetapotentialbetrages kommen sollte. Ein weiterer wichtiger Punkt stellte hier die durch PEGylierung typischerweise hervorgerufene sterische Stabilisierung der Partikel dar. Der Nachweis einer ausreichenden sterischen Stabilisierung wäre auch gleichzeitig der Nachweis für eine erfolgreiche PEGylierung der Partikeloberfläche. Die sterische Stabilisierung sollte außerdem während des Autoklavierens stabil bleiben, um die Dispersionen sterilisieren zu können. Die Sterilität der Dispersionen stellt einen wichtigen Aspekt hinsichtlich einer parenteralen Anwendung dar.

Ebenfalls war die Beantwortung der Fragen von Interesse, ob neben einer direkten Herstellung von PEGylierten Partikeln auch eine nachträgliche PEGylierung der Oberfläche möglich ist. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, welche alternative Substanz bei den smektischen Partikeln für eine PEGylierung eingesetzt werden könnte. Oberflächenmodifizierungen, die zu positiv oder negativ geladenen Partikeln führen, stellen ebenfalls einen interessanten Aspekt dar. Geladene Partikel spielen z.B. eine wichtige Rolle in Hinblick auf eine Beladung durch Adsorption von entgegengesetzt geladenen Wirkstoffen wie Nukleinsäuren oder Peptiden [13, 14]. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich smektische Partikel mit positiv geladener Oberfläche herstellen lassen.

Ein Vorteil der unterkühlt-smektischen Lipidnanopartikel ist, dass sie auf physiologischen Bestandteilen, wie Cholesterolestern und Phospholipiden, basieren. Allerdings sind beide Substanzen anfällig gegenüber Oxidation und Hydrolyse, weshalb ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung der chemischen Stabilität der Systeme und deren Verbesserung lag.

Die smektische Phase stellt einen Übergangszustand zwischen dem festen und dem flüssigen Zustand dar und besitzt daher gewisse Eigenschaften von beiden Zuständen. Um

weitere Informationen über die Eigenschaften der smektischen Phase auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden Elektronenspinresonanz-Untersuchungen durchgeführt, die einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit darstellten. Hier wurde die Mobilität und die molekulare Umgebung von ESR-Spinsonden als „Modell-Arzneistoffe“ untersucht, sowie die Zugänglichkeit der Modellsubstanzen von der Wasserphase aus und der Transfer aus den smektischen Partikeln in ein lipophiles Akzeptormedium.

Kapitel 2

Allgemeiner Teil

2.1 Kolloidale Arzneistoffträgersysteme für die parenterale Applikation

Kolloidale Arzneistoffträgersysteme stellen alternative Formulierungen dar, um problematische Arzneistoffe, z.B. schwer wasserlösliche oder lipophile Substanzen, ohne den Einsatz von Lösungsmitteln oder Lösungsvermittlern (z.B. Ethanol und Cremophor EL in Taxol®) zu solubilisieren und somit eine ausreichende Bioverfügbarkeit und parenterale Applikation zu ermöglichen [10, 15, 16]. Neben dem Schutz von instabilen biologischen Molekülen wie Peptiden oder Proteinen bieten kolloidale Arzneistoffträgersysteme die Möglichkeit einer veränderten Freisetzung und einer Anreicherung des Wirkstoffs am Wirkort (*drug targeting*) [10]. Die Arzneistoffträger, deren Größe im Nanometerbereich liegt, können in Polymer- und Lipidsysteme unterteilt werden. Für Polymernanopartikel werden entweder bioabbaubare synthetische Materialien wie Polymilchsäure (PLA) und ihre Copolymere mit Glykolsäure (PLGA) oder Polyalkylcyanoacrylate (PACA) oder natürliche hydrophilere Polymere wie Gelatine, Chitosan oder Albumin verwendet [17]. Nachteil der Polymernanopartikel sind die Herstellungsverfahren, bei denen meist organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen (z.B. Emulsionspolymerisation oder Lösungsmittelverdampfungsverfahren), und die sich nicht unbedingt für die Produktion im Großmaßstab eignen [17]. Kolloidale Lipidsysteme zur parenteralen Anwendung wie Liposomen, Lipidnanoemulsionen oder feste Lipidnanopartikel können dagegen aus physiologischen Lipiden wie Triglyceriden, Cholesterol und Phospholipiden mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt werden, einem etablierten Verfahren, das keine organischen Lösungsmittel benötigt und ein einfaches *Scale-up* ermöglicht [15].

2.1.1 Liposomen

Liposomen sind Vesikel, die aus einer oder mehreren Phospholipid-Doppelschichten bestehen und eine wässrige Phase einschließen. Sie können lipophile, amphiphile und hydrophile Arzneistoffe aufnehmen. Lipophile Arzneistoffe halten sich innerhalb der Phospholipid-Doppelschichten auf, hydrophile Arzneistoffe im wässrigen Innenraum und amphiphile Arzneistoffe können sich wie Phospholipide in die Liposomenmembran einlagern [18]. Oft enthalten die Liposomenmembranen auch Cholesterol zur Erhöhung der Membrandichtigkeit [19]. Anhand ihrer Größe und Lamellarität werden Liposomen in kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, „SUV“), große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, „LUV“), große oligolamellare Vesikel (*oligolamellar large vesicles*, „OLV“), multivesikuläre Vesikel (*multivesicular vesicles*, „MVV“) und große multilamellare Vesikel (*multilamellar large vesicles*, „MLV“) unterteilt. Zur Herstellung von Liposomen sind viele mögliche Herstellungsverfahren wie Extrusion, Ultraschallbehandlung oder Hochdruckhomogenisation beschrieben [18]. Allerdings sind bisher nur wenige Liposomen-Präparate im Handel, entweder als wässrige Dispersionen (z.B. mit Doxorubicin: Myocet®) oder gefriergetrocknetes Pulver (z.B. mit Amphotericin B: AmBisome®) [20]. Dies liegt vor allem an Problemen hinsichtlich der chemischen und physikalischen Stabilität. In wässrigen Dispersionen sind Liposomen nur begrenzt lagerfähig, da es zur Hydrolyse der Phospholipide oder auch zur Oxidation ungesättigter Phospholipide kommen kann. Weitere Probleme können ein Wirkstoffaustritt aus den Vesikeln oder Aggregation bzw. Fusion der Vesikel sein [19]. Durch Gefriertrocknung kann meistens die Stabilität verbessert werden. Eine verlängerte Zirkulationszeit im Blutkreislauf wird durch eine sterische Abschirmung der Oberfläche mittels PEG-Ketten erreicht („*stealth-Effekt*“ [12], siehe Abschnitt 2.3.1.1) z.B. bei Doxorubicin-enthaltenden PEGylierten Liposomen (Caelyx®). Mit Liposomen, die z.B. Amphotericin B oder antineoplastischen Wirkstoff enthalten, werden gezielt höhere Konzentration am Wirkort erreicht und Nebenwirkungen reduziert [19].

2.1.2 Kolloidale Lipidemulsionen

Kolloidale Lipidemulsionen als Wirkstoffträgersysteme sind aus den Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung hervorgegangen und stellen bereits gut untersuchte Systeme dar, die lipophile Substanzen in den Emulsionstropfen solubilisieren können [21, 22, 23]. Auf dem Markt befinden sich z.B. mit Diazepam (Diazepam-Lipuro®), Etomidat (Etomidat-Lipuro®), Propofol (Propofol 1% MCT Fresenius®) oder fettlöslichen Vitaminen (Freka-Vit®) beladene Emulsionspräparate [20]. Die Lipidphase besteht in der Regel aus Sojaöl, teilweise in Kombination mit etwas polareren Lipidkomponenten wie mittelkettigen oder acetylierten Triglyceriden. Als Stabilisator werden Ei-Phospholipide eingesetzt [15, 20].

Zur Herstellung von Nanoemulsionen wird häufig die Hochdruckhomogenisation, die sich auch für die Produktion im Großmaßstab eignet, verwendet [16, 23]. Hinsichtlich der Solubilisierungskapazität sind häufig Triglycerid-Öle mit höherer Polarität oder Tocopherolderivate als Lipidphase für schwer wasserlösliche Substanzen besser geeignet als sehr unpolare Öle wie langkettige Triglyceride (z.B. Tocol-Emulsion für Paclitaxel) [15, 24]. Viele Arzneistoffe besitzen eine gewisse Oberflächenaktivität und können sich dann in die Grenzfläche der Tropfen einlagern, wobei es allerdings durch Beeinflussung des Zetapotentials zu Instabilitäten kommen kann [25]. Die Wirkstoffmoleküle sind in der flüssigen Fettphase sehr beweglich und die meisten Arzneistoffe werden nach Applikation schnell freigesetzt [26]. Nur wenige Arzneistoffe weisen einen so hohen Verteilungskoeffizienten auf, dass sie eine stark verzögerte Freisetzung zeigen [15].

2.1.3 Feste Lipidnanopartikel

Um die Nachteile der Lipidemulsionen (z.B. Koaleszenz oder zu schnelle Wirkstofffreisetzung) und Liposomen (z.B. Stabilitätsprobleme) zu überwinden, wurden feste Lipidnanopartikel (*solid lipid nanoparticles*, „SLN“) entwickelt. Aufgrund ihres festen Zustands erhoffte man sich eine verzögerte Wirkstofffreisetzung durch eine stärkere Immobilisierung der Arzneistoffe in der kristallinen Matrix und eine bessere physikalische und chemische Stabilität [15]. Für die festen Lipidnanopartikel werden z.B. feste Triglyceride, Fettsäuren oder Wachse als Matrix verwendet und als Stabilisatoren werden u.a. Phospholipide, Gallensalze, Poloxamer oder Polysorbat eingesetzt. Die Herstellung kann analog derer der Lipidemulsionen mit Hochdruckhomogenisation erfolgen, wobei hier meist oberhalb der Schmelztemperatur der Lipide homogenisiert wird und anschließend die Partikel durch Abkühlen auskristallisiert werden [15]. Weitere mögliche Herstellungsverfahren sind die Ausfällung aus O/W-Mikroemulsionen [27], die Lösungsmittel-Diffusionstechnik [28] oder auch Emulsions-Fällungsverfahren [29]. Eine große Breite an Arzneistoffen wurde bereits in Dispersionen fester Lipidnanopartikel inkorporiert [15]. Die Aufnahmekapazität in die hoch geordnete kristalline Lipidmatrix ist allerdings für die meisten Wirkstoffe begrenzt [15]. Die Wirkstoffe können aber nicht nur in der Lipidmatrix lokalisiert sein, sondern auch an der Partikeloberfläche oder ggf. in anderen kolloidalen Strukturen wie Liposomen, die sich zusätzlich in der Wasserphase befinden können [4]. Viele kristalline Lipidnanopartikel besitzen eine stark anisometrische, plättchenförmige Gestalt und daher eine größere spezifische Partikeloberfläche als Emulsionstropfen mit einer wahrscheinlich höheren Adsorptionskapazität für einige Arzneistoffe [15]. Die Untersuchung des Freisetzungsverhaltens aus festen Lipidnanopartikeln, die für eine mögliche intravenöse Applikation entwickelt werden, stellt eine gewisse Herausforderung dar und die erwartete verzögerte Wirkstofffrei-

setzung konnte bis jetzt nur vereinzelt gezeigt werden [3, 15]. Oft wurde eine sehr schnelle Freisetzung (*burst-release*) beobachtet und erste Untersuchungen zum Vergleich des Freisetzungsverhaltens von festen und flüssigen Lipidnanopartikeln, deuten auf eine vergleichbare oder höhere Freisetzungsgeschwindigkeit aus festen Lipidnanopartikeln hin [15]. Ein Vorteil der festen Partikel ist ihre Stabilität gegenüber Koaleszenz, allerdings können bei manchen Systemen Nachteile wie Partikelgrößenwachstum, Gelierungstendenz oder langsam verlaufende polymorphe Umwandlungen auftreten [2, 30, 31]. Werden bestimmte Triglyceride (z.B. Trilaurin oder Trimyristin) verwendet, können bei der Herstellung mittels Hochdruck-Schmelzhomogenisation kolloidale Emulsionen unterkühlter Schmelzen entstehen [32]. Dieses Phänomen beruht auf der starken Unterkühlungstendenz der flüssigen Lipidphase im kolloidalen Zustand im Vergleich zum Bulk-Material. Kolloidale Emulsionen unterkühlter Schmelzen können über einen längeren Zeitraum stabil bleiben, wenn sie nach der Schmelzhomogenisation nicht entsprechend abgekühlt werden, um eine Kristallisation auszulösen [15].

2.1.4 Nanostrukturierte Lipidcarrier

Um die Aufnahmekapazität fester Lipidnanopartikel für Wirkstoffe zu verbessern, wurden nanostrukturierte Lipidcarrier (*nanostructured lipid carriers*, „NLC“) entwickelt [33]. Bei festen Lipidnanopartikeln kann es zu einem Wirkstoffausstoß während der Kristallisation der Lipidmatrix oder während der Lagerung durch eine polymorphe Umwandlung in die stabilere kristalline Modifikation kommen [33]. Durch die Verwendung von hochkomplexen Lipidmischungen oder zusätzlichen flüssigen Lipiden sollen Störungen der hochkristallinen Ordnung der Lipidmatrix erreicht und Platz für Fremdmoleküle geschaffen werden [33, 34]. Zumindest bei einer Beladung mit größeren Mengen an Öl zeigte sich aber, dass das Öl bei der Kristallisation der Lipidmatrix austritt und sich Lipidtröpfchen auf der Partikeloberfläche bilden [35, 36, 37].

2.2 Flüssigkristalline Lipidnanopartikel

2.2.1 Flüssigkristalline Zustände

Flüssigkristalline Phasen (Mesophasen) stellen einen Übergang zwischen dem festen und dem flüssigen Zustand dar und besitzen sowohl Eigenschaften von isotropen Flüssigkeiten (Beweglichkeit auf molekularer Ebene) als auch von Kristallen (Ordnungszustand der Moleküle) [38]. Man kann zwischen lyotropen und thermotropen Mesophasen unterscheiden.

Thermotrop-flüssigkristalline Phasen können von bestimmten Substanzen, deren Moleküle eine anisometrische Form aufweisen, in Abhängigkeit von der Temperatur gebildet werden. Löst man amphiphile Substanzen (z.B. Tenside) in einem geeigneten Lösungsmittel, können lyotrop-flüssigkristalline Phasen (z.B. lamellar, hexagonal oder kubisch) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Konzentration entstehen [38]. Der Begriff „fließende Kristalle“ wurde durch Lehmann 1889 eingeführt [39], erstmals beschrieben wurde der flüssigkristalline Zustand aber anhand von Cholesterolbenzoat 1888 von Reinitzer [40].

Sowohl aus lyotrop- als auch aus thermotrop-flüssigkristallinen Phasen können flüssigkristalline Nanopartikel (*liquid crystalline nanoparticles*, „LNCP“) hergestellt werden, die sich in der Entwicklung als potentielle Wirkstoffträgersysteme für unterschiedliche Applikationswege befinden.

2.2.2 Lyotrop-flüssigkristalline Nanopartikel

Lyotrop-flüssigkristalline Phasen werden im kosmetischen und pharmazeutischen Bereich eingesetzt [41, 42] und im kolloidalen Zustand als Arzneistoffträger-Systeme schon länger untersucht als thermotrop-flüssigkristalline Nanopartikel [38, 43]. Lyotrope Mesophasen, die aus hydrophilen amphiphilen Substanzen bestehen, lösen sich beim Verdünnen mit Wasser auf. Daher eignen sich für die Herstellung von lyotrop-flüssigkristallinen Nanopartikeln nur bestimmte amphiphile Substanzen mit niedriger Polarität z.B. Monoglyceride oder langkettige Phospholipide, deren Mesophasen in einem Überschuss an Lösungsmittel stabil bleiben. Zu den von ihnen gebildeten Mesophasen gehören die lamellare Phase, invers-hexagonale Phase (H_2), invers-bikontinuierliche kubische Phase (V_2) und die Schwammphase (sponge phase, L_3) [44, 45]. Die dispergierten Mesophasen (z.B. Cubosomen[®], Hexosomen[®]) können als Trägersysteme für lipophile, amphiphile oder hydrophile Wirkstoffe verwendet werden [46]. Lipophile und amphiphile Wirkstoffe halten sich in den Lipidlayern auf, wohingegen sich hydrophile Substanzen bei einigen Systemen in den Wasserkanälen befinden. Für die Herstellung von Cubosomen[®] wird z.B. Monoolein (Glycerolmonoleat) verwendet, das mit Wasser invers-bikontinuierliche kubische Phasen (V_2) bildet. Es handelt sich um ein regelmäßiges dreidimensionales Lipidbilayer-Netzwerk, das mit Wasserkanälen durchzogen ist. Die Zerkleinerung in Nanopartikel kann z.B. mittels Hochdruckhomogenisation in Anwesenheit eines Emulgators wie Poloxamer 407 erfolgen [47]. Für lipophile Wirkstoffe eignen sich lyotrop-flüssigkristalline Nanopartikel hauptsächlich nur zur Solubilisierung, da sie nach intravenöser Applikation häufig recht schnell abgebaut werden und eine verzögerte Freisetzung noch nicht beobachtet werden konnte [38, 48, 49]. Des Weiteren sind in Hinblick auf eine parenterale Applikation der lyotrop-flüssigkristallinen Nanopartikel noch Probleme mit Partikelfractionen

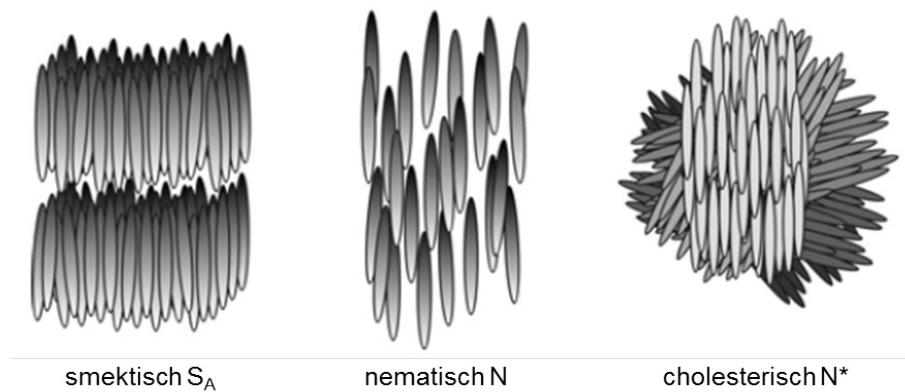


Abbildung 2.1: Struktur kalamitischer Mesophasen (aus [1]).

im Mikrometerbereich sowie unzureichender physikalischer und chemischer Stabilität zu lösen [46, 49, 50].

2.2.3 Thermotrop-flüssigkristalline Nanopartikel

Zu den thermotropen Flüssigkristallen gehört u.a. die Gruppe der kalamitischen Mesophasen. Diese können von bestimmten Substanzen mit einer stäbchenförmigen Molekülgestalt ausgebildet und in smektische und nematische Phasen eingeteilt werden. In der nematischen Phase sind die Moleküle nahezu parallel zueinander ausgerichtet, wohingegen in der smektischen Phase die Moleküle nicht nur annähernd parallel, sondern außerdem noch in Schichten angeordnet sind [51] (Abbildung 2.1). Es gibt unterschiedliche Modifikationen der smektischen Phase, z.B. die smektische A-Phase oder C-Phase. In der A-Phase liegen die Moleküle senkrecht und in der C-Phase geneigt bezüglich der smektischen Schichten vor [38]. Zu den nematischen Phasen gehört die cholesterische Phase. Hier liegen einzelne nematische Molekülschichten vor, die zueinander verdreht sind, so dass sie eine Helixstruktur bilden (Abbildung 2.1). Eine Anwendung thermotrop-flüssigkristalliner Phasen findet sich derzeit nur im technischen Bereich, z.B. in Flüssigkristallanzeigen (*liquid crystal displays*, „LCD“) [52]. Bei einigen Arzneistoffen z.B. Ciclosporin oder Itraconazol-Hydrochlorid wurden thermotrope Mesophasen beobachtet [53] und ebenfalls bei Cholestereestern. Gesättigte Cholesterester wie Cholesterylmyristat bilden sowohl eine smektische A-Phase als auch eine cholesterische Phase aus [54]. Im pharmazeutischen Bereich fanden die thermotropen Mesophasen aber lange Zeit wenig Beachtung. Erst 2004 wurden unterkühlt-smektische Cholesterester-Nanopartikel als ein mögliches alternatives Carriersystem zu Lipidnanoemulsionen und festen Lipidnanopartikeln eingeführt [1].

2.2.3.1 Unterkühlt-smektische Cholesterolester-Nanopartikel

Um die Aufnahmekapazität für Wirkstoffe im Vergleich zu festen Lipidnanopartikeln zu verbessern, wurden Partikel mit einer thermotrop-flüssigkristallinen Matrix entwickelt, die unterkühlt-smektischen Lipidnanopartikel [1].

Die Lipidmatrix der unterkühlt-smektischen Nanopartikel besteht aus bestimmten Cholesterolestern wie z.B. Cholesterylmyristat oder Cholesterylnonanoat. Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Körpertemperatur befinden sich die Partikel im smektischen Zustand. Dieser könnte einerseits aufgrund seiner hohen Viskosität Vorteile hinsichtlich der physikochemischen Stabilität gegenüber Lipidemulsionen und andererseits durch die hohe Beweglichkeit der Moleküle Vorteile hinsichtlich der Beladungskapazität gegenüber festen Lipidnanopartikeln bieten. Als Stabilisatoren können wie bei den festen Lipidnanopartikeln z.B. Phospholipide, Gallensalze, Poloxamer oder Polysorbat eingesetzt werden [1]. Des Weiteren wurden bereits einige lipophile Arzneistoffe mit einer Konzentration von 10% in die Nanopartikel inkorporiert [1].

Die Herstellung der smektischen Partikel kann durch Hochdruck-Schmelzhomogenisation oder Lösungsmittelverdampfungsverfahren erfolgen. Da das Bulkmaterial bei Raumtemperatur kristallin ist, wird es für die Hochdruckhomogenisation aufgeschmolzen. Bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt des Cholesterolesters wird eine Prä-Emulsion hergestellt und anschließend hochdruckhomogenisiert. Hierbei werden Partikelgrößen von etwa 100 - 200 nm erreicht [1]. Alternativ kann die Herstellung mittels Lösungsmittelverdampfungsverfahren erfolgen, wenn z.B. hohe Temperaturen vermieden werden sollen. Hierfür wird der Cholesterolester in einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel (z.B. Cyclohexan) gelöst [55]. Bei Raumtemperatur wird eine Rohdispersion hergestellt und unter Kühlen hochdruckhomogenisiert. Das Lösungsmittel wird danach mittels Vakuum-Rotationsverdampfung entfernt. Auf diesem Wege können Partikelgrößen kleiner 100 nm erreicht werden, allerdings sind mögliche Rückstände an organischem Lösungsmittel zu berücksichtigen [1].

Die Herstellung smektischer Cholesterolester-Nanopartikel basiert auf der starken Unterkühlungstendenz der smektischen Phase der Cholesterolester. Beim Abkühlen z.B. von geschmolzenem Cholesterylmyristat verbleibt die Lipidmatrix in der smektischen Phase, bevor sie erst unterhalb von Raumtemperatur kristallisiert [1]. Diese Unterkühlungstendenz ist bei der Bulkphase und besonders stark im kolloidalen Zustand zu beobachten, da die Kristallisation größtenteils durch eine homogene Keimbildung ausgelöst wird [32]. Damit eine Kristallisation erfolgt, muss es nach Unterschreiten des Schmelzpunktes erst zu einer Kristallkeimbildung kommen, welche ab einer kritischen Unterkühlung spontan stattfindet (homogene Keimbildung). Eine Kristallisation kann aber auch schon vorher

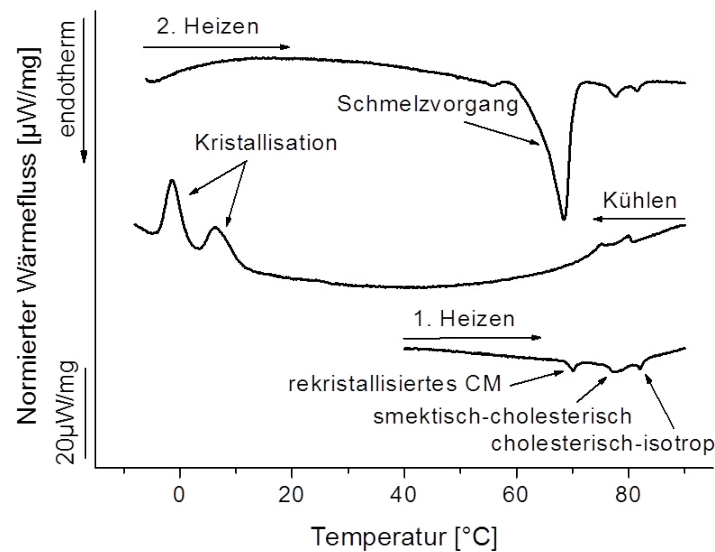


Abbildung 2.2: DSC-Kurven, die das allgemeine Phasenverhalten von Cholesterylmyristat-Nanodispersionen (stabilisiert mit Lipoid S100/Natriumglycocholat) darstellen.

einsetzen z.B. durch vorhandene Verunreinigungen, die eine Kristallkeimbildung erleichtern (heterogene Keimbildung). Im Bulkmaterial können geringfügig Verunreinigungen zu finden sein, an denen eine heterogene Kristallkeimbildung stattfindet. Die Kristallisation breitet sich danach schnell über das ganze Material aus. Im kolloidalen Zustand finden sich die Verunreinigungen nur in einer geringen Anzahl an Partikeln wieder, so dass die Kristallisation auf diese Partikel beschränkt ist. Aus diesem Grund ist ein höherer Grad an Unterkühlung zur Kristallkeimbildung in Dispersionen notwendig als im Bulkmaterial [32].

Bei den unterkühlt-smektischen Cholesterolster-Nanopartikeln ist die smektische Phase aufgrund der stark verzögerten Kristallisation bei einer Lagerung bei Raumtemperatur metastabil und kann über mehrere Monate erhalten bleiben [56].

Das Phasenverhalten der smektischen Partikel kann mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, „DSC“) bestimmt werden und ist stark abhängig von dem jeweils verwendeten Cholesterolster und Stabilisator sowie der Partikelgröße. Cholesterylmyristat-Partikel zeigen ein vollständig reversibles Phasenverhalten [38]. Das generelle Phasenverhalten von Phospholipid-stabilisierten unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Kurve des ersten Heizens zeigt zwei kleine flüssigkristalline Phasenübergänge (smektisch-cholesterisch und cholesterisch-isotrop). Falls während der Herstellung oder der Lagerung etwas Lipidmatrix auskristallisiert, wird ein Schmelzvorgang bei 65-68 $^{\circ}\text{C}$ detektiert. Beim Kühlen der isotropen Partikel treten die flüssigkristallinen Phasenübergänge nahezu bei denselben Temperatu-

ren wie beim Heizen auf. Aufgrund der starken Unterkühlung kristallisiert die smektische Phase erst unterhalb der Raumtemperatur. Das bimodale Kristallisationsereignis ist typisch für Phospholipid-stabilisierte Nanopartikel und abhängig von der Partikelgröße [56]. Es wird angenommen, dass die Fläche des Peaks bei höheren Temperaturen die Kristallisation von großen (kugelförmigen) Partikeln darstellt, wohingegen der Peak bei niedrigeren Temperaturen der Kristallisation von kleineren (zylinderförmigen) Partikeln entspricht [56]. Insgesamt ist das Kristallisationsverhalten nicht nur von der Partikelgröße abhängig, sondern auch von der Morphologie, dem Stabilisatorsystem und der thermischen Vorbehandlung [7, 56]. Bei Cholesterylnonanoat-Partikeln ist z.B. die Kristallisation so stark verzögert, dass die Partikel beim Abkühlen auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht kristallisieren [55]. Zur Charakterisierung des smektischen Zustandes kann zusätzlich die Röntgendiffraktometrie herangezogen werden, da aufgrund der Schichtstruktur der smektischen Phase ein Röntgenkleinwinkelreflex auftritt (z.B. bei Cholesterylmyristat-Dispersionen: Schichtabstand (d) $\approx 34,9 - 35,2\text{ }\text{\AA}$ bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [7]). Kleine Mengen an rekristallisiertem Matrixlipid lassen sich ebenfalls durch DSC- oder Röntgenuntersuchungen detektieren.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die smektischen Partikel meistens eine annähernd zylinderförmige Gestalt aufweisen. In Abhängigkeit vom Stabilisator können auch zusätzlich kugelförmige Partikel (Systeme mit Stabilisatoren, die eine Fettsäuregruppe enthalten, z.B. Phospholipide oder Natriumoleat) oder insgesamt eher „pflasterstein-artige“ Formen (Polymer-stabilisierte Systeme, z.B. mit Poloxamer oder PVA) auftreten [7].

Hinsichtlich einer parenteralen Applikation der unterkühlt-smektischen Cholesterolester-Nanopartikel sind die Sterilisierbarkeit und die Verträglichkeit der Dispersionen wichtig. Eine Autoklavierung der Dispersion ist bei der Verwendung von Poloxamer, Poloxamin oder einer Phospholipid/Gallensalz-Mischung möglich [57]. Erste Studien zur Zytotoxizität weisen auf eine relativ gute Verträglichkeit hin. Eine Untersuchung an Mausfibroblasten (Zelllinie L929) mittels Sulforhodamin B-Assay zeigte keine oder nur eine geringfügig höhere Zytotoxizität der smektischen Partikel im Vergleich zu einer kolloidalen Fettemulsion [58]. Bei einer Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay (Mausfibroblasten, Zelllinie L929) führten kristalline Lipidnanopartikel zu einer stärkeren Abnahme der Viabilität als flüssigkristalline Lipidnanopartikel. Unterkühlt-smektische Cholesterolmyristat-Partikeldispersionen zeigten eine vergleichbare oder etwas geringere Verträglichkeit als Trimyristin-Emulsionen [59].

Hinsichtlich der Zusammensetzung der Lipidmatrix besitzen Cholesterolester-Nanopartikel eine gewisse Ähnlichkeit mit Lipoproteinen geringer Dichte (LDL). LDL stellen ein physiologisches Trägersystem für lipophile Substanzen wie Cholesterol im Blut dar, dessen Kern v.a. aus ungesättigten Cholesterolestern und einer geringen Menge an Triglyceriden

besteht, umgeben von einer Phospholipid-Schicht, freiem Cholesterol und dem Apolipoprotein B-100 [60]. Die LDL-Partikel besitzen eine Größe von ungefähr 20 nm [61, 62]. Über das Apolipoprotein bindet LDL an spezifische LDL-Rezeptoren und wird durch Endozytose in die Zellen aufgenommen [63]. Da die meisten Tumorzellen aufgrund ihres schnellen Wachstums einen erhöhten Cholesterolbedarf haben, ist die Anzahl der LDL-Rezeptoren in solchen Zellen hochreguliert. Humanes LDL [61, 63] und proteinfreie LDL-ähnliche Emulsionen (LDE) [64, 65] sind daher als Arzneistoffträgersysteme für Zytostatika interessant. LDL enthalten nicht nur große Mengen an Cholesterolestern, sie befinden sich bei Raumtemperatur in einem flüssigkristallinen Zustand [66] und besitzen eine annähernd zylinderförmige Gestalt [67]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit von LDL zu unterkühlt-smektischen Cholesterolester-Nanopartikeln ist ein möglicher Einsatz für ein LDL-Rezeptor-Targeting ein weiterer Hintergrund für die Entwicklung von unterkühlt-smektischen Cholesterolester-Nanopartikeln gewesen. Hierzu gibt es aber bisher noch keine Untersuchungen. Allerdings liegt bei LDL der Phasenübergang vom flüssigkristallinen Zustand in den isotropen Zustand nahe oder unterhalb der Körpertemperatur [66, 68] und der geordnete Zustand geht daher bei Körpertemperatur verloren. Im Gegensatz dazu liegt der Phasenübergang bei den von Bunjes et. al untersuchten Cholesterolester-Nanopartikeln, mit Ausnahme von Cholesterylleat-Partikeln, oberhalb der Körpertemperatur [55].

2.3 Oberflächenmodifikationen an kolloidalen Partikeln

2.3.1 Passives und aktives Targeting

Nach intravenöser Applikation können kolloidale Trägersysteme dazu beitragen, den Arzneistoff am Wirkort verstärkt anzureichern und somit verhindern, dass ein großer Teil des Arzneistoffs im ganzen Körper verteilt wird und dadurch zu unerwünschten Wirkungen führt. Es gibt zwei verschiedene Mechanismen, entweder passiv durch das Ausnutzen bestimmter Eigenschaften der kolloidalen Partikel und des Zielgewebes oder aktiv durch die Kopplung von Zielvektoren an die Oberfläche der Partikel [69]. Allerdings werden kolloidale Partikel normalerweise nach intravenöser Applikation innerhalb kürzester Zeit vollständig durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) eliminiert. Es findet eine Adsorption von bestimmten Plasmaproteinen (Opsonine) an die Partikeloberflächen statt, gefolgt von Phagozytose durch Macrophagen und Abtransport in die Leber und Milz [8]. Dadurch kommt es zwar zu einer Anreicherung der Partikel im MPS, aber eine Anreicherung in anderen Geweben ist nicht mehr möglich. Diese Art des passiven Targetings lässt sich allerdings therapeutisch zur Behandlung von Infektionen nutzen, bei denen die Macrophagen betroffen sind, wie z. B. zur Therapie der viszerale Leishmaniose oder

systemischer Mykosen mit in Liposomen verkapseltem Amphotericin B (AmBisome®) [9]. Eine weitere Möglichkeit des passiven Targetings bietet sich durch den EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*) von Tumorgewebe [69]. Im Gegensatz zu normalem Gewebe zeigt malignes Tumorgewebe ein schnelles Wachstum mit einer extensiven Ausbildung von Blutgefäßen. Das vaskuläre Endothel weist eine deutlich größere Fenestrierung auf und besitzt somit eine höhere Permeabilität für kolloidale Partikel, außerdem ist der Abtransport der Partikel durch ein mangelhaftes lymphatisches System im Tumorgewebe erschwert, so dass es zu einer Anreicherung der Partikel kommt [70]. Um den EPR-Effekt therapeutisch zu nutzen, ist allerdings eine ausreichend lange Blutzirkulationszeit der Carrier notwendig. Eine verlängerte Zirkulationszeit ist ebenfalls Voraussetzung für das aktive Targeting. Um an den Zielort zu gelangen, müssen die Carrier der Elimination durch das MPS entgehen. Das Ausmaß der Opsonierung ist u.a. abhängig von der Partikelgröße und der Oberflächenladung, z.B. zeigen Partikel kleiner als 100 nm, wie auch neutrale oder negativ geladene Partikel, eine geringere Plasmaproteinadsorption als größere oder positiv geladene Partikel [71]. Für das passive Targeting via EPR-Effekt eignen sich Partikel < 200 nm [16, 69].

2.3.1.1 Verlängerung der Zirkulationszeit - PEGylierung

Um lang-zirkulierende kolloidale Trägersysteme zu erhalten, können geeignete Polymere an die Partikeloberfläche gebunden oder adsorbiert werden. Voraussetzung ist, dass die Polymere Ketten aufweisen, die hydrophil und hoch flexibel sind. Aus den vielen möglichen Kettenkonformationen entsteht dann eine hydrophile „Wolke“ um die Partikel, deren Dichte hoch genug ist, um die Adsorption von Proteinen im Blut (Opsoninen) zu verhindern. Eingesetzt werden Polymere wie z.B. PEG(Polyethylenglykol)-Derivate (Poloxamin, Poloxamer, Polysorbate, PEG-PLA, PEG-Lipide), PVP (Polyvinylpyrrolidon), Polyglycerole, Polyaminosäuren oder Polyoxazoline [9, 72, 73].

Bei den ersten Versuchen, die Zirkulationszeit von Liposomen zu verlängern, wurde die Liposomenoberfläche mittels Polysacchariden oder Glycolipiden modifiziert, wobei sich der Einbau von Gangliosid GM₁ als effektiv erwies [74]. Als eine günstigere und sicherere Alternative zu GM₁ wurden Anfang der 90er Jahre erstmals Polyethylenglykol-Lipid-Derivate eingesetzt und die so modifizierten Liposomen als *Stealth*®-Liposomen bezeichnet [12, 75, 76]. Durch den PEG-Teil entsteht die gewünschte hydrophile, flexible Korona um die Liposomen, die nicht nur die Interaktion mit Proteinen reduziert, sondern auch die Liposomen zusätzlich sterisch stabilisiert [77]. Bei Nanopartikeln [78, 79] und Nanoemulsionen [11, 80] konnte ebenfalls die Zirkulationszeit durch PEGylierung verlängert werden. Die Effektivität hängt von der Länge, Dichte und Konzentration der PEG-Ketten

ab [9, 11]. Meistens werden PEG-Ketten mit einer Molekularmasse von 2-5 kDa eingesetzt [9]. Bei Liposomen findet man am häufigsten 3-7 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (N-(carboxymethoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) oder MPEG₂₀₀₀-DPPE (N-(carboxymethoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), zu große Konzentration führen zur Bildung von Mischmizellen und zur Auflösung der Liposomen [9]. Bei Emulsionen können dagegen höhere Konzentrationen z.B. 10-15 mol% MPEG_{2000/5000}-DSPE eingesetzt werden [81]. Die PEGylierung kann entweder durch Adsorption, Inkorporation während der Herstellung oder durch kovalente Bindung an die Oberfläche der Partikel durchgeführt werden [9].

Allerdings scheint eine Mehrfachinjektion von PEGylierten Carriern nicht unproblematisch zu sein, da hier das ABC (*accelerated blood clearance*)-Phänomen beobachtet wurde. Nach der ersten Injektion von PEGylierten Carriern tritt zwar die gewünschte Verlängerung der Zirkulationszeit auf, bei den folgenden Injektionen ist diese dann aber drastisch verkürzt [82, 83]. Das ABC-Phänomen ist abhängig von PEGylierungsgrad, Größe und Oberflächenladung der Carrier [84]. Des Weiteren können bei PEG-Liposomen, wie auch bei anderen Polymer-Carriern, Überempfindlichkeitsreaktionen durch Komplementaktivierung auftreten [85]. Das ABC-Phänomen kann aber auch durch eine Injektion von nicht-PEGylierten Liposomen hervorgerufen werden [86].

PEGylierung von kolloidalen Trägersystemen wird mittlerweile weitverbreitet zur Verlängerung der Blutzirkulationszeit eingesetzt. Die Quantifizierung der PEGylierung stellt allerdings immer noch eine nicht einfache Aufgabe aufgrund der geringen spektrophotometrischen Eigenschaften des PEG dar [87]. Eine Quantifizierung der eingeführten PEG-Moleküle ist wichtig, da der Grad der PEGylierung entscheidend für die Abschirmung der Partikeloberfläche ist. Die ersten erfolgreichen Versuche verwendeten kolorimetrische Assays, bei denen freie PEG-Moleküle in z.B. Plasmaprotein-Zubereitungen mit Bariumiodid komplexiert wurden [88]. Das Absorptionsmaximum der Komplexe konnte zur quantitativen Analyse verwendet werden. Später gelang es, durch Derivatisierung UV-aktive PEG-Moleküle wie PEG-Dibenzoate herzustellen. Für eine Detektion von PEG, ohne das Molekül zu verändern, können Methoden wie Kernspinresonanzspektroskopie, Massenspektroskopie, Flammenionisations- oder Brechungsindex-Detektion angewendet werden [87]. Vor der Detektion müssen freies PEG, PEGylierte und nicht-PEGylierte Komponenten z.B. durch chromatographische Techniken oder Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung getrennt werden.

Die PEG-Ketten an der Partikeloberfläche bilden eine hydrophile Korona, die die Oberfläche und damit ggf. auch eine Oberflächenladung der Partikel abschirmt. PEGylierte Partikel unterscheiden sich daher durch ein geringeres Zetapotential, im Fall von geladenen Partikeln, und einer sterischen Stabilisierung von entsprechenden nicht-PEGylierten

Partikeln. Das Zetapotential wird reduziert, da die PEG-Ketten den Abstand zwischen Partikeloberfläche und Scherebene vergrößern [78]. Des Weiteren weisen PEGylierte Partikel aufgrund der sterischen Barriere durch die PEG-Ketten eine reduzierte Opsonisierung durch Plasmaproteine (z.B. Apolipoproteine, Albumin, Fibrinogen, Immunglobuline) auf [78]. Die Unterschiede im Proteinadsorptionsmuster können z.B. durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Inkubation mit Blutplasma und Separierung durch Zentrifugation bestimmt werden [89]. Durch die verringerte Interaktion mit Plasmaproteinen ist die Erkennung und Aufnahme der Partikel durch Macrophagen reduziert. Eine geringere Phagocytose fluoreszenzmarkierter Partikel kann z.B. mit Hilfe von in vitro-Tests mit Maus-Macrophagen beobachtet werden [90]. Der Schutz vor Elimination durch Macrophagen führt zu einer verlängerten Zirkulationszeit der Partikel im Blut, die durch Biodistributionsuntersuchungen von z.B. radioaktivmarkierten und intravenös applizierten Partikeln in Mäusen nachgewiesen werden kann [78].

2.3.1.2 Aktives Targeting

Für ein aktives Targeting werden an die Oberfläche der Carrier Liganden angebracht, die spezifisch an Oberflächenepitope oder Rezeptoren im Zielgewebe binden können. Als Liganden werden u.a. kleine Moleküle (z.B. Folsäure oder Ferritin), Peptide, Lektine, Antikörper oder Antikörperfragmente verwendet [69, 91]. Liposomen, die mit Antikörpern gekoppelt sind, werden als Immunoliposomen bezeichnet [9, 92]. Vielversprechende Antikörper für das Tumor-Targeting sind z.B. die monoklonalen Antikörper gegen die Antigene HER2 oder CD19. Eine Überexpression dieser Antigene kommt häufig auf verschiedenen Krebszellen vor [69, 93]. Immunoliposomen werden meistens zusätzlich PEGyliert, da sonst eine erhöhte Bindung an die Zielzellen aufgrund einer zu kurzen Blutzirkulationszeit nicht erreicht wird. Damit die Liganden weiterhin frei zugänglich sind, können sie an die Enden der PEG-Ketten gekoppelt werden. Zum Beispiel kann Folsäure über einen PEG-Spacer an Liposomen oder Nanopartikel gekoppelt werden, um spezifisch an die Folsäurerezeptoren in bestimmten Tumorgeweben zu binden [94, 95]. Die kovalente Kopplung von Apolipoprotein E über einen PEG-Linker an Albumin-Nanopartikel oder auch die Adsorption von Apolipoprotein E an Polysorbat 80-stabilisierte Nanopartikel soll eine Nachahmung von Lipoprotein-Partikeln bewirken und somit einen gezielten Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen [96, 97]. Über das Apolipoprotein E können die Nanopartikel an die entsprechenden LDL-Rezeptoren der Endothelzellen im Gehirn binden und internalisiert werden [98].

2.3.2 Oberflächenladung

Bei fehlender sterischer Stabilisierung der Partikel ist eine ausreichende Oberflächenladung für die physikalische Stabilität gegenüber Aggregation wichtig. Negativ oder positiv geladene Partikel können aber auch in Hinblick auf eine Beladung durch Adsorption mit entgegengesetzt geladenen Arzneistoffen wie Nukleinsäuren oder Peptiden interessant sein. Eine negative Oberflächenladung wird v.a. durch die Verwendung von anionischen Stabilisatoren wie Gallensalzen oder bestimmten Phospholipiden (z.B. Lipoid S75, Phosphatidylglycerol) erzeugt [23, 99]. Diese kann durch elektrostatische Interaktion der anionischen Gruppen an der Partikeloberfläche mit kationischen Wirkstoffen (z.B. Peptide wie Calcitonin [14]) zu deren Adsorption an die Partikeloberfläche führen. Positiv geladene Oberflächen finden z.B. bei nanopartikulären Nukleinsäure-Trägersystemen für den nicht-viralen Gentransfer in der Gentherapie Verwendung [13]. Hier soll das Transgen mit Hilfe des Trägermaterials in Zellen eingeschleust werden (Transfektion), im Gegensatz zum viralen Gentransfer, bei dem das Transgen in replikationsdefiziente Viren verpackt und in Zellen eingeschleust wird (Transduktion). Für die Herstellung nicht-viraler Gentherapeutika werden z.B. positiv geladene Liposomen oder Polymersomen, die mit negativ geladenen DNA- oder mRNA-Sequenzen, Plasmiden oder Oligonukleotiden Komplexe bilden (Lipoplexe bzw. Polyplexe), verwendet. Kationische Polymere, die im Rahmen der Gentherapie eingesetzt werden, sind z.B. PEI (Polyethylenimin), PLL (Poly(L-Lysin)) oder auch Chitosan [100, 101]. Als kationische Lipide kommen unter anderem DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), DOTAP (1,2-diacyl-3-trimethylammoniumpropan) oder DC-Chol ([N-(N, N-dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol) zum Einsatz [102, 103]. Zusätzlich werden positiv geladene kolloidale Systeme als Carrier oder Adjuvantien für Protein-Antigene oder DNA in Impfstoffen untersucht [104].

Carrier mit positiv geladener Oberfläche wie z.B. kationische Liposomen zeigen eine stärkere immunstimulierende Wirkung und Aufnahme in Macrophagen und dendritische Zellen als neutrale oder anionische Liposomen [105]. Durch elektrostatische Interaktion der positiv geladenen Carrier mit negativ geladenen Bestandteilen von Zellmembranen in verschiedenen Organen (z.B. Haut, Auge oder Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes) kann auch die Aufnahme von inkorporierten Arzneistoffen verbessert werden [106]. Des Weiteren wurde für positiv geladene Nanoemulsionen nach intravenöser Applikation ein gezielter Arzneistofftransport in die Lunge und eine verlängerte Zirkulationszeit im Blut beobachtet [106].

2.4 Chemische Stabilität Phospholipid-stabilisierter kolloider Trägersysteme

Phospholipide werden häufig als Stabilisatoren in kolloidalen Arzneistoffträgersystemen und Fettemulsionen für die parenterale Ernährung verwendet [3, 15, 107, 108, 109]. Der Vorteil von Phospholipiden ist, besonders in Hinblick auf eine intravenöse Applikation, ihre gute physiologische Verträglichkeit im Vergleich zu anderen grenzflächenaktiven Substanzen wie Polymeren oder klassischen Tensiden. Da Phospholipide in wässrigen Systemen anfällig für Hydrolyse sind, beschäftigt sich eine Vielzahl an Studien mit der chemischen Stabilität von pharmazeutischen Phospholipid-stabilisierten Emulsionen [110] und Liposomen [111]. Die Hydrolyse von Phospholipiden führt zur Bildung von Lyso-Derivaten (z.B. Lyso-Phosphatidylcholin) und freien Fettsäuren (siehe Abbildung 2.3). Lyso-Phosphatidylcholin ist toxisch, da es u.a. die Lyse von Blutzellen verursacht [112]. Lyso-Phosphatidylcholin kann eine gesteigerte Permeabilität und Destabilisierung von Liposomen verursachen [113], wohingegen die Bildung von freien Fettsäuren und Lyso-Derivaten in Emulsionen aufgrund der Zunahme der negativen Oberflächenladung zu einer größeren physikalischen Stabilität führt [114]. Zur chemischen Stabilität von Phospholipid-basierten Suspensionen ist nur begrenzt Information verfügbar [115]. Obwohl Phospholipide oft verwendet werden, um Suspensionen von Arzneistoffkristallen [115, 116, 117] oder Lipidnanopartikel [3, 15, 118] zu stabilisieren, konzentrieren sich die meisten Studien allein auf die physikalische Stabilität. Es wird im Allgemeinen nicht berücksichtigt, dass mögliche Zersetzungsprodukte die Partikeleigenschaften stark beeinflussen können und sich demzufolge auch auf die physikalische Stabilität auswirken.

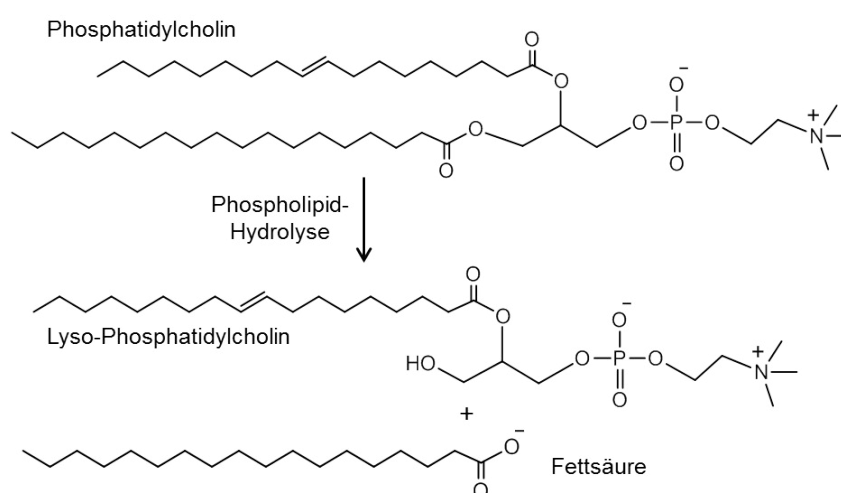


Abbildung 2.3: Bildung von Lyso-Phosphatidylcholin und freier Fettsäure durch Hydrolyse.

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Matrixlipid

Als Matrixlipid wurde das physiologische Lipid Cholesterylmyristat verwendet. Dieser Cholesterolester besteht aus Cholesterol und Myristinsäure. Die Struktur ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Das Cholesterylmyristat wurde von TCI Europe NV (B-Zwijndrecht) bezogen. Der Hersteller gibt eine Reinheit von 99,5% an. Der Schmelzpunkt liegt bei 84 °C. Aufgrund der anisometrischen, länglichen Molekülform kann Cholesterylmyristat zwei thermotrop flüssigkristalline Phasen ausbilden. Kristallines Cholesterylmyristat geht beim Erwärmen vom kristallinen Zustand in die smektische Phase über (ca. 72 °C), gefolgt von einer cholesterischen Phase (ca. 79 °C) und schmilzt dann zu einer isotropen Flüssigkeit (ca. 84 °C) [1].

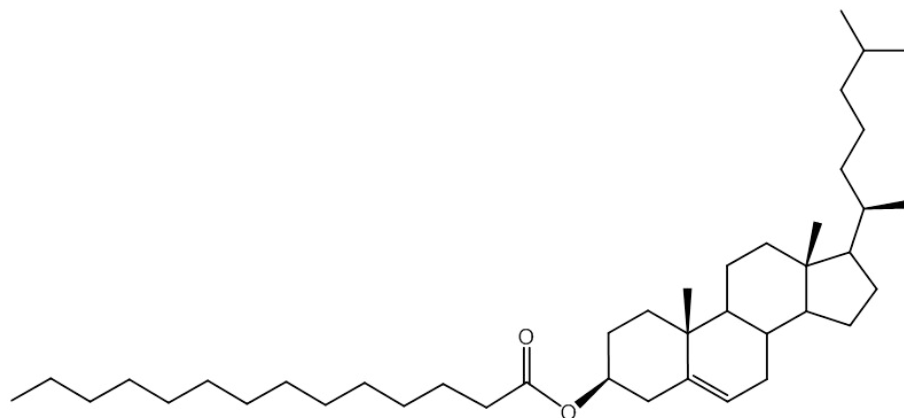
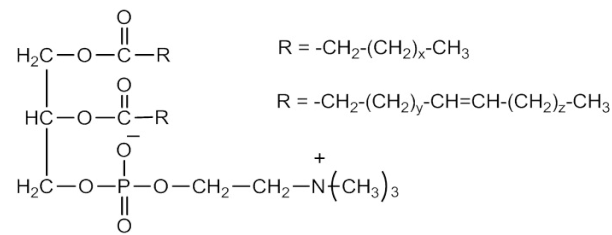


Abbildung 3.1: Struktur von Cholesterylmyristat

Phosphatidylcholin



Phosphatidylethanolamin

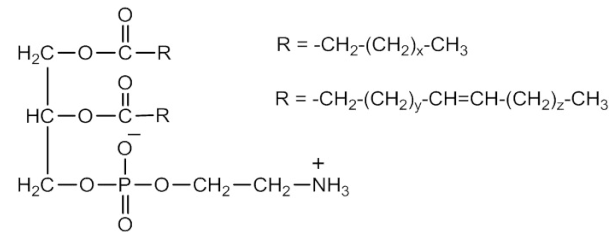
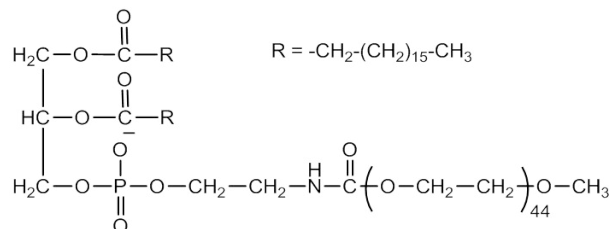
MPEG₂₀₀₀-DSPE

Abbildung 3.2: Struktur der eingesetzten Phospholipide

3.1.2 Stabilisatoren

3.1.2.1 Phospholipide

Phospholipide sind Hauptbestandteil von biologischen Membranen und kommen in allen Lebewesen (Menschen, Tieren, Pflanzen und Algen) und in vielen Mikroorganismen vor. Sie sind amphiphile Verbindungen, da sie aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Kohlenwasserstoffrest aufgebaut sind, die über ein Grundgerüst miteinander verbunden sind. Je nach Grundgerüst unterscheidet man Glycerophospholipide (Glycerol-Grundgerüst) und Sphingophospholipide (Sphingosin-Grundgerüst) [119]. Die hier verwendeten Phospholipide enthalten als Hauptbestandteil Glycerophospholipide entweder mit Cholin oder mit Ethanolamin als hydrophile Kopfgruppe (Phosphatidylcholin bzw. Phosphatidylethanolamin, siehe Abbildung 3.2). Die hydrophile Kopfgruppe ist über eine Phosphatgruppe mit dem Glycerol-Grundgerüst verbunden. Die anderen beiden Hydroxyl-Gruppen des Glycerol-Grundgerüsts sind mit Fettsäuren verestert. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin liegen über einen breiten pH-Bereich als Zwitterion vor, da das Stickstoffatom eine positive und die Phosphatgruppe eine negative Ladung

trägt [109]. Natürlich vorkommende Phospholipide zeigen eine komplexe Fettsäurezusammensetzung, die abhängig von ihrer Herkunft ist, z.B. weisen Sojabohnen-Phospholipide einen größeren Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf als Ei-Phospholipide [109, 120]. Aufgrund ihres physiologischen Vorkommens sind sie gut verträglich und werden (v.a. Ei-Phospholipide) schon lange als Emulgatoren in Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung eingesetzt [121]. Die hier verwendeten Phospholipide wurden von Lipoid GmbH (D-Ludwigshafen) bezogen. Die Sojabohnen-Phospholipide Lipoid S100 (S100) und Lipoid S75 (S75) unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Gehalt an Phosphatidylcholin (PC). Lipoid S100 enthält mindestens 94% PC. Lipoid S75 besteht dagegen aus 68-73% PC, 7-10% Phosphatidylethanolamin sowie bis zu 3% Lyso-Phosphatidylcholin [122]. Das PEGylierte Phospholipid MPEG₂₀₀₀-DSPE (N-(carbonyl-methoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) ist synthetisch hergestellt und besitzt daher eine definierte Zusammensetzung. Es handelt sich um Distearylphosphatidylethanolamin, das mit einer Polyethylenglykol-Kette verbunden ist. Die mittlere Molekularmasse der PEG-Kette beträgt 2 kDa (entspricht 44 Ethylenoxid-Einheiten), siehe Abbildung 3.2.

3.1.2.2 Natriumglycocholat

Natriumglycocholat (NaGC, Natriumglycocholat Hydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim, Reinheit ca. 99%) gehört zu den physiologisch vorkommenden Gallensalzen (Abbildung 3.3). Obwohl es sich bei den Gallensalzen um anionische Tenside handelt, sind sie in Kombination mit Phospholipiden gut verträglich [109] und werden in parenteralen Produkten eingesetzt (z.B. Konakion[®] MM, [20]).

3.1.2.3 Poloxamer 188

Poloxamere gehören zu den nichtionischen Tensiden. Es handelt sich um Blockcopolymere mit aba-Struktur aus unterschiedlich vielen Ethylenoxid (a)- und Propylenoxid (b)-Einheiten. Poloxamer 188 (Lutrol F68, BASF, D-Ludwigshafen) besteht aus ungefähr 79

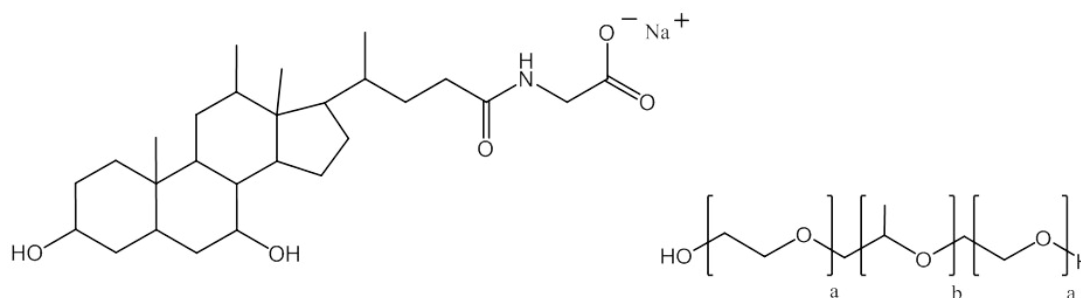


Abbildung 3.3: Struktur von Natriumglycocholat (links) und Poloxamer (rechts).

Ethylenoxid- und 28 Propylenoxid-Einheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 7680-9510 g/mol (Abbildung 3.3). Poloxamere werden als sterische Stabilisatoren eingesetzt und können wie PEGylierte Phospholipide bei Nanopartikeln eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit bewirken [9].

3.1.2.4 DDAB

Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB, Sigma Chemicals, US-St. Louis, Reinheit $\geq 98\%$) ist ein kationisches Lipid, siehe Abbildung 3.4. Es wird z.B. als Bestandteil kationischer Liposomen zur Transfektion verwendet [102, 123]. In dieser Arbeit wurde es eingesetzt, um smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel mit positiv geladener Oberfläche herzustellen.

3.1.3 Wasserqualität

Mit einem Bi-Destillierapparat 2102 (GFL, D-Burgwedel) wurde bidestilliertes Wasser gewonnen und zur Herstellung der wässrigen Phase der Dispersionen und zum Spülen des Homogenisators verwendet. Für analytische Zwecke wurde hochgereinigtes Wasser (ASTM Type 1 reagent-grade) aus einem EASYpureTM LF compact ultrapure water System (Barnstead Thermolyne Corporation, US-Dubuque) verwendet.

3.1.4 Weitere Materialien

Lipofundin[®] MCT 20% (B.Braun Melsungen AG, D-Melsungen) ist eine Emulsion zur intravenösen Infusion im Rahmen einer parenteralen Ernährung und besteht aus Sojabohnenöl 10,0%, mittelkettige Triglyceride (MCT) 10,0%, Eilecithin 1,2%, Glycerol 2,5%, α -Tocopherol und Wasser für Injektionszwecke [124]. In dieser Arbeit wurde Lipofundin[®] MCT 20% als lipophiles Akzeptormedium für Transferuntersuchungen mittels Elektrenspinresonanz eingesetzt.

Alle weiteren Materialien sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.



Abbildung 3.4: Struktur von DDAB

Tabelle 3.1: Sonstige Materialien

Material	Bezugsquelle	Reinheit
Miglyol 812N	Sasol, D-Witten	k.A.
Tris-Base	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs	$\geq 99,0\%$
Glycerol, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs	Ph. Eur. 6.0
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 98,0\%$
Thiomersal	Caelo, D-Hilden	Ph. Eur. 6.0
Ethanol, wasserfrei	Riedel-de Haën, D-Seelze	<i>p.A.</i>
Calciumchlorid	Carl Roth, D-Karlsruhe	$\geq 98\%$
Phosphorsäure 85%	Carl Roth, D-Karlsruhe	Ph. Eur. 6.0
Salzsäure 37%	Carl Roth, D-Karlsruhe	Ph. Eur. 6.0
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, D-Darmstadt	$> 99,5\%$
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, D-Darmstadt	$> 99,5\%$
Deuteriumoxid	Deutero GmbH, D-Kastellaun	99,9%
Chloroform-dn	Deutero GmbH, D-Kastellaun	99,8%
α -Tocopherol	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 96\%$
Natirum-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 99,9\%$
1-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 99,9\%$
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 99,9\%$
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 99,9\%$
Ölsäure	Caelo, D-Hilden	Ph. Eur. 6.0
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Carl Roth, D-Karlsruhe	$\geq 99\%$
Essigsäure	Carl Roth, D-Karlsruhe	100% <i>p.A.</i>
Methylacetat	Carl Roth, D-Karlsruhe	$\geq 99\%$
Kaliumchlorid	Merck, D-Darmstadt	$> 99,5\%$
Chloroform	Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte	HPLC <i>grade</i>
n-Hexan	Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte	HPLC <i>grade</i>
Diethylether	Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte	HPLC <i>grade</i>
Tetrahydrofuran	Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte	HPLC <i>grade</i>
Dichlormethan	Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte	HPLC <i>grade</i>
Natriumascorbat	Caelo, D-Hilden	Ph.Eur. 6.0
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	$\geq 99,0\%$
16-Doxyl-Stearinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	k.A.
3 β -Doxyl-5 α -Cholestan	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	k.A.
4-Hydroxy-TEMPO-benzoat	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	97%
C18-Tempo-tempilstearat	Spende von P. Ahlin, SLO-Ljubljana	k.A.
Methyl-5-Doxyl-Stearat	Sigma-Aldrich Chemie, D-Steinheim	k.A.

3.2 Methoden

3.2.1 Zusammensetzung und Herstellung der Dispersionen

3.2.1.1 Zusammensetzung

In der Regel bestanden die Dispersionen aus 2,5% Cholesterylmyristat (Lipidmatrix) in einer wässrigen Phase, die mit 2,25% Glycerol isotonisiert und 0,01% Thiomersal konserviert wurde. Alle Konzentrationsangaben sind m/m und beziehen sich auf die gesamte Dispersion vor der Homogenisation. Die Ansatzgröße betrug 40 g. In einigen Fällen enthielt die wässrige Phase zusätzlich noch 10 mM TRIS- oder Phosphatpuffer (pH 7,4) zur pH-Wert-Einstellung. Stabilisiert wurden die Systeme mit 1,6% Phospholipid oder einer Kombination aus 1,6% Phospholipid mit 0,4% Natriumglycocholat. Ggf. wurde noch ein oberflächenmodifizierender Zusatz (MPEG₂₀₀₀-DSPE, Poloxamer 188, DDAB) oder weitere Substanzen (α -Tocopherol, EDTA, Ölsäure) mitverarbeitet. Die Herstellung dieser Dispersionen wird in Abschnitt 3.2.1.5 erläutert. Es wurden außerdem Dispersionen hergestellt, die mit 2% Poloxamer 188 stabilisiert waren. Die Zusammensetzung der Dispersionen für die ESR-Untersuchungen ist in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben.

3.2.1.2 Hochdruckhomogenisation

Die Herstellung der Systeme erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation oberhalb der Schmelztemperatur des Lipides (Schmelzhomogenisation). Für die Hochdruckhomogenisation wurde ein Microfluidizer M110-PS (Microfluidics, US-Newton) verwendet. Dieser gehört zu den Gegenstrahldispersatoren. Die Voremulsion wird mit einer Hochdruckpumpe durch eine statische Interaktionskammer (Typ F12Y DIXC) gepresst. Die Interaktionskammer besteht aus 2 Mikrokanälen, so dass der Produktstrom in zwei Teilstrahle aufgespalten wird. Am Ende der Interaktionskammer werden die Teilstrahle wieder zusammengeführt. Die Produktströme treffen mit hoher Geschwindigkeit aufeinander und die Partikel werden v.a. durch starke Scherkräfte, sowie auch Kavitations- und Prallkräfte zerkleinert [23, 125]. Der Zerteilungsgrad wird durch die Prozessparameter Temperatur, Druck und Homogenisierungsdauer beeinflusst. Während der Homogenisation wurde das Produkt über einen isolierten Schlauch in den Vorratsbehälter zurückgeleitet. Um die hohen Temperaturen für die Homogenisation zu erreichen, wurde der Homogenisator zusätzlich vor der Homogenisation mit heißem Wasser gespült und die Interaktionskammer mit nachfolgender Leitungsschleife in einem Wasserbad temperiert. Der Homogenisationsdruck wurde durch Regulierung des Vordrucks eingestellt und während der Homogenisation mit einem Manometer vor der Interaktionskammer überprüft. Während der Homogenisation kann

es zu einer geringfügigen Verdünnung der Proben kommen, da immer etwas Wasser im Leitungssystem des Homogenisators zurückbleibt. Der erste Homogenisier-Hub wurde aus diesem Grund jedes Mal verworfen.

Für die Herstellung wurde die Lipidphase (Cholesterylmyristat) bei 95 °C im Wasserbad geschmolzen. Die Stabilisatoren wurden in der wässrigen Phase dispergiert (über Nacht zur Äquilibrierung der Phospholipide) bzw. gelöst und ebenfalls auf 95 °C erhitzt. Die heiße wässrige Phase wurde dann zu der Lipidphase gegeben und im Wasserbad bei 95 °C mit dem Ultra-Turrax (T25 digital Ultra Turrax, Dispergierwerkzeug S25N-8G, IKA, D-Staufen) für 2 Minuten mit 22000-24000 rpm vorhomogenisiert. Die Rohemulsion wurde in den temperierten Homogenisator überführt und für 5 Minuten bei 86-88 °C und 930 bar homogenisiert. Nach dem Abkühlen der Dispersionen auf Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bei 20 °C unter Lichtschutz.

Aliquote einiger Dispersionen wurden in 2 ml-Vials (Zscheile&Klinger, D-Hamburg) in einem Kleinautoklaven (TKL-MCS53, Wolf SANOclav, D-Bad Überkingen-Hausen) sterilisiert (121 °C, 2 bar, 20 min).

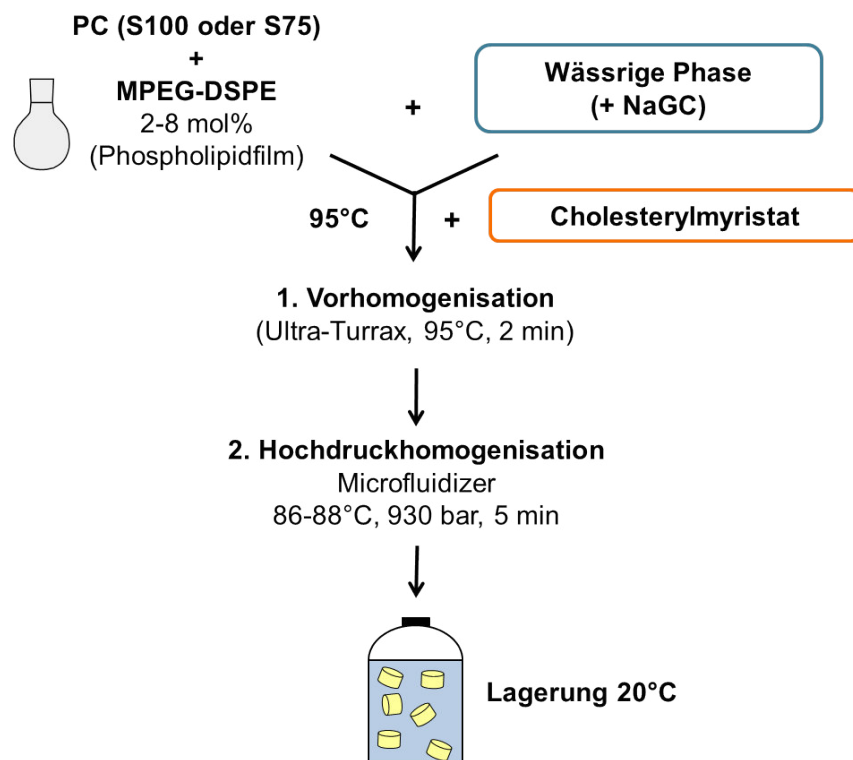


Abbildung 3.5: Konventionelle Herstellung PEGylierter Cholesterylmyristat-Nanopartikel.

3.2.1.3 Herstellung PEGylierter Nanopartikel

Für die Herstellung PEGylierter unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel (Abbildung 3.5) wurde das Sojabohnen-Phospholipid Lipoid S100 oder S75 als Stabilisator verwendet bzw. eine Mischung aus 1,6% Lipoid S100 und 0,4% NaGC. Für die Oberflächenmodifizierung wurden 2-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (zusätzlich und bezogen auf die Menge an Phospholipid) verwendet. Dabei wurde ein Molekulargewicht von 786 g/mol für S100 und 777 g/mol für S75 (berechnet anhand der durchschnittlichen Zusammensetzung laut Herstellerangabe [122]) sowie 2788 g/mol für MPEG₂₀₀₀-DSPE [122] angenommen. Das Sojabohnen-Phospholipid wurde in einem entsprechendem Volumen an ethanolischer MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung gelöst (S100: 22,7 mg/ml bzw. S75: 23,0 mg/ml) und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum-Rotationsverdampfer (Rotavapor RE121, Büchi, D-Essen) bei 40 °C entfernt. Der entstandene Phospholipidfilm wurde mit der wässrigen Phase (enthielt ggf. NaGC) hydratisiert und über Nacht dispergiert (VXR basic VIBRAX, IKA, D-Staufen). Die wässrige Stabilisator-Mischung wurde dann wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben weiterverarbeitet.

3.2.1.4 Herstellung positiv geladener Nanopartikel

Um unterkühlt-smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel mit positiv geladener Oberfläche herzustellen, wurde das kationische Lipid Dimethyloctadecylammoniumbromid (DDAB) als oberflächenmodifizierender Zusatz in einer Konzentration von 8 mol% bzw. 12 mol% (zusätzlich und bezogen auf die Menge an Phospholipid) eingesetzt. Als Stabilisator enthielten die Dispersionen 1,6% Lipoid S100. Dabei wurde ein Molekulargewicht von 786 g/mol für S100 und 631 g/mol für DDAB angenommen. Das Lipoid S100 wurde in einem entsprechenden Volumen an ethanolischer DDAB-Lösung gelöst (8 mol%: 4,11 mg/ml bzw. 12 mol%: 6,17 mg/ml) und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum-Rotationsverdampfer (Rotavapor RE121, Büchi, D-Essen) entfernt. Der entstandene Phospholipidfilm wurde mit der wässrigen Phase hydratisiert und über Nacht dispergiert (VXR basic VIBRAX, IKA, D-Staufen). Die wässrige Stabilisator-Mischung wurde dann wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben weiterverarbeitet.

3.2.1.5 Herstellung weiterer Systeme

Für die Untersuchungen zur chemischen Stabilität wurde eine Dispersion mit 1,6% S100, 0,4% NaGC und 0,4% Ölsäure, eine Dispersion mit 1,6% S100 und 0,01% α -Tocopherol und eine Dispersion mit 1,6% S100 und 100 μ M EDTA hergestellt (alle Konzentrationen sind m/m und beziehen sich auf die gesamte Dispersion vor der Homogenisation).

Die Fettsäure und das α -Tocopherol wurden vor dem Schmelz- und Homogenisationsprozess zum Cholesterylmyristat hinzugegeben, EDTA wurde in der Wasserphase gelöst. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben.

3.2.1.6 Herstellung PEGylierter Partikel mittels nachträglicher PEGylierung

Für die „*post-insertion*“ Methode wurden zunächst nicht-PEGylierte Nanopartikel hergestellt, die ein negatives Zetapotential aufwiesen, damit ggf. eine erfolgreiche PEGylierung durch die Abschirmung der Oberflächenladung zu erkennen war. Für die nicht-PEGylierten Nanopartikel (Ausgangssprobe) wurde daher 1,6% Lipoid S75 als Stabilisator verwendet, da dieses neben PC und PE auch negativ geladene Bestandteile wie Lyso-PC enthält. Die eingesetzten MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentrationen betrugen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 mol% (zusätzlich und bezogen auf die Menge an Phospholipid, wobei ein Molekulargewicht von 777,4 g/mol für S75 und 2788 g/mol für MPEG₂₀₀₀-DSPE angenommen wurde). Es wurde eine wässrige 1%-ige MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung hergestellt und je 200 μ l der Ausgangssprobe wurden mit der entsprechenden Menge an MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung 90 Minuten inkubiert. Die unterschiedliche Verdünnung durch die MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösungen wurde bei den Auswertungen der später durchgeführten Messungen berücksichtigt. Insgesamt wurden zwei Probenreihen hergestellt (Abbildung 3.6). Eine Probenreihe wurde bei 23 °C und die andere bei 60 °C inkubiert, um einen Einfluss der Temperatur auf die Einlagerung der PEGylierten Phospholipide in die Oberfläche der Partikel zu untersuchen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 20 °C in HPLC-Vials.

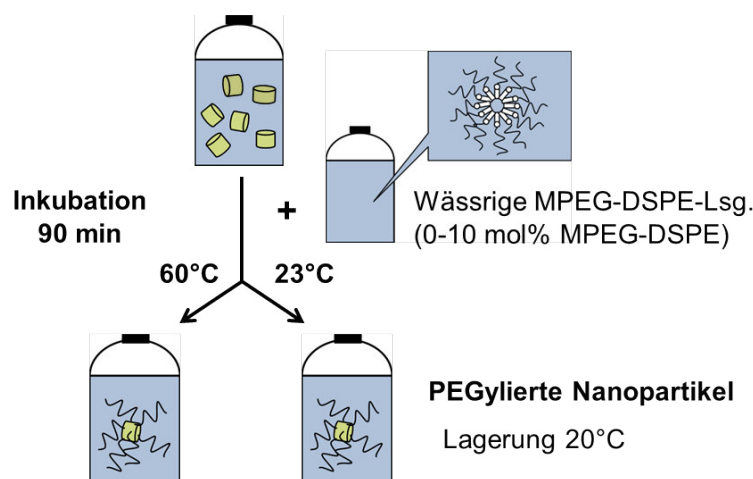


Abbildung 3.6: Herstellung PEGylierter Cholesterylmyristat-Nanopartikel mittels nachträglicher PEGylierung.

3.2.2 Partikelgrößenanalyse mittels Photonenkorrelations-spektroskopie (PCS)

Mit der Photonenkorrelationsspektroskopie wurden ein intensitätsgewichteter mittlerer hydrodynamischer Durchmesser (*Z-Average*) und der Polydispersitätsindex (PdI, Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung) ermittelt. Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizers Nano ZS (Malvern Instruments, UK-Malvern). Zuvor wurden die Proben mit hochgereinigtem Wasser auf eine Matrixlipidkonzentration von 0,003% verdünnt. Jede Probe wurde bei 25 °C und nach einer Äquilibrationszeit von 5 Minuten unter einem Winkel von 173° dreimal hintereinander vermessen. Die Dauer einer Einzelmessung betrug 5 Minuten. Es wurde immer der Mittelwert mit Standardabweichung der drei Messungen berechnet und in den Abbildungen dargestellt. Die Berechnung und Auswertung erfolgte mit der Dispersion Technology Software 5.10, dabei wurde für das Dispersionsmedium eine Viskosität von 0,8872 mPa*s und ein Brechungsindex von 1,330 zugrunde gelegt. Die vom Instrument berechnete intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung wurde ebenfalls bei der Datenauswertung verwendet.

3.2.3 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential wurde mittels M3-PALS-Technologie mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK-Malvern) bestimmt. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, mit sterilfiltriertem TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) auf eine Matrixlipidkonzentration von 0,003% verdünnt. Für die Stabilitätsuntersuchungen (Abschnitt 4.1.5) wurden die Proben mit sterilfiltriertem Phosphatpuffer (10 mM, pH-Werte 2-9 eingestellt mit 0,5 M NaOH bzw. verdünnter Phosphorsäure) bzw. sterilfiltrierter Calciumchlorid-Lösung (Konzentration 0,16 mM - 25 mM) auf eine Matrixlipidkonzentration von 0,003% verdünnt. Jede Probe wurde nach einer Äquilibrationszeit von 5 Minuten bei 25 °C dreimal hintereinander vermessen, wobei eine Messung aus 30 Einzelmessungen bestand. Für die Messungen wurden Zetapotential-Küvetten (DTS 1060) nach Überprüfung mit dem Zeta Potential Transfer Standard (DTS1230, Malvern Instruments, UK-Malvern) verwendet. Angegeben wird immer der Mittelwert der drei Messungen. Für die Auswertung wurde eine Viskosität von 0,8872 mPa*s, ein Brechungsindex von 1,330 und als relative Dielektrizitätskonstante 78,5 für das Dispersionsmedium zugrunde gelegt. Sie erfolgte unter Verwendung des Smoluchowski-Modells mit der Dispersion Technology Software 5.10.

3.2.4 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die DSC-Messungen (*differential scanning calorimetry*, „DSC“) wurden auf einer DSC1 mit dem Sensor FRS5 (Mettler Toledo AG Analytical, CH-Schwerzenbach) mit einer Heiz- bzw. Kühlrate von 5 °C/min durchgeführt. Das Temperaturprogramm bestand aus einem ersten Heizschritt von 25 °C auf 90 °C, gefolgt von einem Kühlvorgang auf -10 °C und einem zweiten Heizschritt auf 95 °C. Zwischen den Temperaturscans wurde die Temperatur für 5 Minuten isotherm gehalten. Ungefähr 7-10 mg Probe wurde exakt in Aluminium-Tiegel (Seiko Instruments, D-Neu-Isenburg) eingewogen und kaltverschweißt. Ein leerer Tiegel wurde als Referenz verwendet. Alle DSC-Kurven wurden auf eine Probenmasse von 1 mg normiert und aus Übersichtlichkeitsgründen in den Abbildungen entlang der y-Achse verschoben. Die Kalibrierung wurde mit Indium und Zink (Schmelzpunkt: Indium 156,6 °C, Zink 419,5 °C; Übergangsenthalpie: Indium 28,5 J/g, Zink 107,5 J/g) durchgeführt, sowie vor und nach jeder Messreihe täglich mit Indium überprüft. Die Datenauswertung erfolgte mit der STAR^e Software Version 9.20. Die Phasenübergangsenthalpien wurden durch Integration der Peakflächen bestimmt. Die Menge an rekristallisiertem Cholesterylmyristat wurde berechnet, indem die Schmelzenthalpie des ersten Heizens mit der des zweiten Heizens (nach Rekristallisation der Partikel) verglichen wurde. Bei dieser Berechnung kann es zu einer geringe Überbewertung des rekristallisierten Anteils kommen, da die Schmelzenthalpie von während der Lagerung kristallisierten Partikel im ersten DSC-Heizvorgang im Vergleich zur Schmelzenthalpie im zweiten Heizvorgang etwas größer ist [1].

3.2.5 Bestimmung des pH-Wertes

Die pH-Werte wurden mittels eines pH-Meters (Microprocessor pH-Meter pH539, WTW, D-Weilheim i. OB) mit einer Polymer-Elektrode (InLab[®] Solids, Mettler Toledo, D-Giessen) bestimmt. Die Messungen wurden in 500 µl der jeweiligen Dispersion durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei Messungen.

3.2.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Messungen wurden eine HPLC-Anlage Waters 717 plus Autosampler und 515 HPLC Pumpe (Waters GmbH, D-Eschborn) verwendet. Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Methode von Carroll und Rudel [126] durchgeführt. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur auf einer Umkehrphasentrennsäule (LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18, Körnung 5 µm, 250 mm x 4 mm, Merck, D-Darmstadt)

und mit isokratischer Elution bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Tetrahydrofuran und Acetonitril (50:50 V/V) eingesetzt. Die Proben wurden in einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Acetonitril (80:20 V/V) gelöst und 30 µl der Probenlösung injiziert. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 213 nm (WatersTM 486 Tunable Absorbance Detektor). Für die Datenauswertung wurde die Software Clarity Chromatography Stations (DataApex, CZ-Prague) verwendet. Der Gehalt an Cholesterylmyristat wurde rechnerisch über eine Kalibriergerade bestimmt.

3.2.7 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die HPTLC-Untersuchungen zur chemischen Stabilität von Dispersionen erfolgten in Anlehnung an die Methode von Kuntsche et al. sowie Yao und Rastetter [57, 127]. Die HPTLC-Platten NanoSILGUR-20/UV₂₅₄, 10 cm x 10 cm (Macherey Nagel, D-Düren) bestanden aus einer Kombinationsschicht aus Kieselgur als Konzentrierungszone und Nano-Kieselgel 60 als Trennzone. Zum Lösen der Proben wurde eine Lösungsmittelmischung aus Chloroform und Methanol (50:50, alle Konzentrationen sind V/V, sofern nicht anders angegeben) verwendet. 50 µl der Dispersionen wurden in 450 µl der Lösungsmittelmischung gelöst bzw. 10 mg Referenzsubstanz in 1000 µl. Um die HPTLC-Platten zu aktivieren, wurden sie vor dem Auftragen in Lösungsmittel A (Zusammensetzung der Laufmittel siehe Tabelle 3.2) vollständig entwickelt und dann für 10 min bei 110 °C getrocknet. 4 µl der Proben wurde mit Hilfe einer 5 µl-Hamiltonspritze (Hamilton, CH-Bonaduz) punktförmig in die Konzentrierungszone aufgetragen. Die Platten wurden nacheinander in den Laufmitteln A, B und C entwickelt und zwischendurch in einem warmen Luftstrom getrocknet. Der erste Entwicklungsschritt im Laufmittel A wurde bis zu einer Höhe von 4,6 cm über der Konzentrierungszone durchgeführt (Trennung polarer Lipide, z.B. Phospholipide), gefolgt von der vollständigen Entwicklungen im Laufmittel B (Trennung apolarer Lipide, z.B. Cholesterylmyristat, Fettsäuren) und C (Verbesserung des Trennergebnisses). Um die Lipid-Banden anzufärben, wurde eine Kupfer(II)-sulfat-Lösung (75 g Kupfersulfat*5 H₂O, 100 ml Phosphorsäure 85%, 900 ml gereinigtes Wasser) verwendet. Die Platten wurden für 3 Sekunden in die Lösung getaucht und ca. 8 min im Trockenschrank bei 170 °C erhitzt.

Um eine reine Probe des unbekannten Cholesterylmyristat-Zersetzungsproduktes für die massenspektrometrische Untersuchung zu erhalten, wurde die mit S75 und 8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierte Probe (nach 6 Monaten Lagerung) gelöst und in die Konzentrierungszone über die komplette Platte aufgetragen, gefolgt von der Entwicklung in den Lösungsmittelmischungen A, B und C, wie oben beschrieben. Um die Position des Zersetzungsproduktes auf der Platte zu bestimmen, wurde ein Streifen von jeder Seite der Platte abgeschnitten und mit Hilfe von Kupfersulfatlösung gefärbt. Die Bande des Zersetzungs-

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Laufmittel für die HPTLC-Untersuchungen

Laufmittel	Zusammensetzung (V/V)
A	26,6 Teile Essigsäuremethylester
	26,6 Teile 1-Propanol
	26,6 Teile Chloroform
	10,6 Teile Methanol
	9,6 Teile Kaliumchlorid-Lösung 0,25% (m/V)
B	75,0 Teile n-Hexan
	23,0 Teile Diethlether
	2,0 Teile wasserfreie Essigsäure
C	100 Teile n-Hexan

produktes wurde ausgekratzt und in eine Glas-Pasteurpipette (gefüllt mit Natriumsulfat und Watte) überführt. Die Eluation der Substanz aus dem Kieselgel erfolgte mittels einer Mischung aus Tetrahydrofuran/Acetonitril (80:20). Das Lösungsmittel des Eluats wurde mit Stickstoff verdampft und der Rückstand wurde unter Lichtschutz gelagert. Insgesamt wurden drei Proben hergestellt.

3.2.8 Massenspektrometrie (MS)

Bei der Massenspektrometrie werden die Analytmoleküle zunächst ionisiert und dann anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt und detektiert. Die Messungen wurden auf dem Massenspektrometer 3200 Q TRAP LC/MS/MS (Applied Biosystems MDS Sciex, D-Darmstadt), ausgestattet mit einer Turbo VTMIonenquelle und einem HPLC System (Agilent Technologies 1200 HPLC system, Agilent, US-Santa Clara), mittels chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) im positiven Modus durchgeführt. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit der Software Analyst 1.4.2. Weitere Parameter: Flussrate 10 µl/min (Cholesterylmyristat) bzw. 5 µl/min (Zersetzungsprodukt), „curtain-gas“ 40,00 Psi, „nebulizer current“ 4 µA, „source temperature“ 350 °C, „nebulizer-and auxiliary gas“ 40,00 Psi, „Interface-heater“ an, „collision gas“ hoch, „declustering potential“ 36,00 V, „entrance potential“ 3,50 V, „collision energy“ 10,00 V, „collision cell entrance potential“ 15,74 V, „scan type“ Enhanced MS. Die Analyse der Proben erfolgte in dreifacher Ausführung.

Für die Probenzubereitung wurde das mittels HPTLC separierte Zersetzungsprodukt des Cholesterylmyristats (siehe Abschnitt 3.2.7) in 60 µl Dichlormethan gelöst und mit 700 µl

Methanol direkt vor der Injektion verdünnt. Als Vergleich wurde eine Referenzlösung aus 1,2 mg Cholesterylmyristat in 1 ml Dichlormethan hergestellt. 350 μ l dieser Referenzlösung wurden mit 700 μ l Methanol für die Injektion verdünnt.

3.2.9 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die ^1H -NMR-Messungen wurden mit der separierten und redispergierten Nanopartikel-Fraktion einer höher konzentrierten Probe (5% CM, 3,2% S100, 6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (entspricht 0,68% (m/m) bezogen auf die gesamte Dispersion), ohne Glycerol und Thiomersal) durchgeführt. Die Separierung der Nanopartikel von der wässrigen Phase erfolgte durch Ultrazentrifugation. Die entsprechende Dispersion wurde auf drei Zentrifugenröhrchen (Ultra-Thin Polyclear centrifuge tubes, Seton Scientific, Los Gatos, USA) aufgeteilt und in einer Ultrazentrifuge (Centrikon T-2060, Kontron Instruments, Zürich, Schweiz) mit Ausschwingrotor (TST 60.4) bei 25 °C und mit 16700 rpm (37900 g) für sieben Stunden zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation mit Hilfe einer Spritze vollständig entfernt. Die Partikelfraktionen wurden vereinigt und in gereinigtem Wasser redispergiert.

Die ^1H -NMR Spektren wurden mit einem NMR-Spektrometer Avance DRX 400 (Bruker Biospin, Rheinstätten, Deutschland) bei 400 MHz und 20 °C, sowie mit einer Impuls-Wiederholungsfrequenz von 5 Sekunden, aufgenommen. Die redispergierte Nanopartikel-Fraktion und mehrere Referenzsysteme (die Original-Dispersion, 0,68% MPEG₂₀₀₀-DSPE gelöst in Wasser (mizellare Lösung), 3,2% S100 dispergiert in Wasser mit Hilfe von Ultraschall (vesikuläre Dispersion), eine Mischung aus 0,68% MPEG₂₀₀₀-DSPE und 3,2% S100 dispergiert in Wasser mit Hilfe von Ultraschall (gemischte kolloidale Dispersion), 5% CM gelöst in deuteriertem Chloroform (Lösung des Matrixlipids)) wurden in NMR-Röhrchen (Wilmad[®] NMR tubes 507-PP-7, Wilmad LabGlass, US-Vineland) gefüllt. Eine Kapillare mit D₂O (Deuterium oxide 99.9%, Deutero GmbH, D-Kastellaun) wurde als Locksubstanz mit in das NMR-Röhrchen gegeben, außer bei der Cholesterylmyristat-Lösung.

3.2.10 Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie)

3.2.10.1 Untersuchung der Verteilung von ESR-Sonden in Lipidnanodispersionen

Für die Untersuchung wurden höher konzentrierte, 5%-ige Cholesterylmyristat-Nanopartikeldispersionen bzw. als Vergleich eine 5%-ige Miglyol-Nanoemulsion, die mit lipophilen ESR-Sonden (Abschnitt 4.6.2) beladen und mit 5% Poloxamer 188 stabilisiert wurden, verwendet. Die Konzentration der ESR-Sonden betrug 0,1 mmol (bezogen auf die gesamte Dispersion). Die ESR-Sonde wurde in einer 1:1-Mischung (V/V) aus Chloroform und Methanol gelöst. 1 ml der jeweiligen Sonden-Lösung wurde vor dem Homogenisierungsprozess (Herstellungparameter siehe Abschnitt 3.2.1.2) zu dem aufgeschmolzenen Cholesterylmyristat bzw. Miglyol hinzugegeben und das Lösungsmittel bei 95 °C abgedampft. Die Messungen wurden mit einem ESR-Spektrometer Miniscope MS 200, X-Band (Magnettech, Berlin, Deutschland) bei einer Mikrowellenfrequenz von etwa 9,5 GHz und bei Raumtemperatur durchgeführt. Folgende Parameter wurden verwendet: Modulationsfrequenz, 100 kHz; Mikrowellenleistung, 10 mW; Scan-Bereich, 9,6 mT; Modulationsamplitude, 0,05 mT. Die Scandauer einer Messung betrug 2047 Sekunden. Um Informationen über die Lokalisation der ESR-Sonden in den Proben zu erhalten, wurden die ESR-Spektren mit der Software EPRSIM (Version 4.9) simuliert. Die Hyperfeinkopplungskonstante a_N und die Rotationskorrelationszeit t_c wurden mit Hilfe von Parametern aus der Simulation berechnet. Bei den abgebildeten ESR-Spektren handelt es sich um Einzelmessungen.

3.2.10.2 Ascorbinsäure-Reduktionsassay

Die Reduktionskinetik der ESR-Sonden in den Proben wurden mit Hilfe des Ascorbinsäure-Reduktionsassays [128] bestimmt. Hierfür wurden die Proben mit 20 mM Natriumascorbat-Lösung (gepuffert mit 10 mM TRIS, pH 7,4, 0,02% NaN_3) 1:1 (V/V) gemischt und zeitabhängige ESR-Messungen durchgeführt. Für den Nullwert wurde die Probe mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4, 0,02% NaN_3) 1:1 (V/V) gemischt. Die Scandauer einer Messung betrug 120 Sekunden. Bei den abgebildeten ESR-Spektren handelt es sich um Einzelmessungen.

3.2.10.3 Transferuntersuchung

Der Transfer der ESR-Sonde C18-Tempo-Tempil-Stearat aus smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln in ein lipophiles Akzeptormedium (Lipofundin® MCT 20%,

B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde durch zeitabhängige ESR-Messungen untersucht, nachdem die Nanopartikel-Dispersion 2:1 (V/V) mit der Fettemulsion gemischt wurde. Die Scandauer betrug jeweils 300 Sekunden. Für den Nullwert wurde die Probe 2:1 (V/V) mit bidestilliertem Wasser gemischt. Bei den abgebildeten ESR-Spektren handelt es sich um Einzelmessungen.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Direkte PEGylierung unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, PEGylierte unterkühlt-smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel zu entwickeln und die PEGylierung sowie die daraus resultierende sterische Stabilisierung nachzuweisen. Um die Oberfläche entsprechend zu modifizieren, wurde das PEGylierte Phospholipid MPEG₂₀₀₀-DSPE (2-8 mol%) zusammen mit konventionellen Phospholipiden (1,6% S100 oder S75), die als Emulgatoren während des Homogenisationsprozesses eingesetzt werden, verarbeitet. Zum Teil wurde das Phospholipid S100 auch in Kombination mit Natriumglycocholat (0,4%) verwendet. Als erstes sollte die PEGylierung auf indirektem Wege nachgewiesen werden. Für diesen Zweck wurden Partikeleigenschaften wie Partikelgröße, Zetapotential, Phasenverhalten und Stabilität gegenüber Rekristallisation untersucht, um Veränderungen aufgrund der Einlagerung von MPEG₂₀₀₀-DSPE in die Partikeloberfläche zu detektieren. Zusätzlich wurde die Stabilität der Partikel bei unterschiedlichen pH-Werten und in Lösungen mit verschiedenen Calciumchlorid-Konzentrationen untersucht, um die erwartete sterische Stabilisierung durch die Anwesenheit des MPEG₂₀₀₀-DSPE in der Grenzflächenschicht zu beweisen. Um das MPEG₂₀₀₀-DSPE an der Partikeloberfläche direkt nachzuweisen, wurden ¹H-NMR-Messungen durchgeführt, nachdem die Partikel mittels Ultrazentrifugation separiert worden waren. Hinsichtlich einer parenteralen Anwendung ist die Sterilisierbarkeit der Dispersionen ein wichtiger Aspekt. Daher wurde außerdem die Stabilität der PEGylierten Partikel nach dem Autoklavieren untersucht.

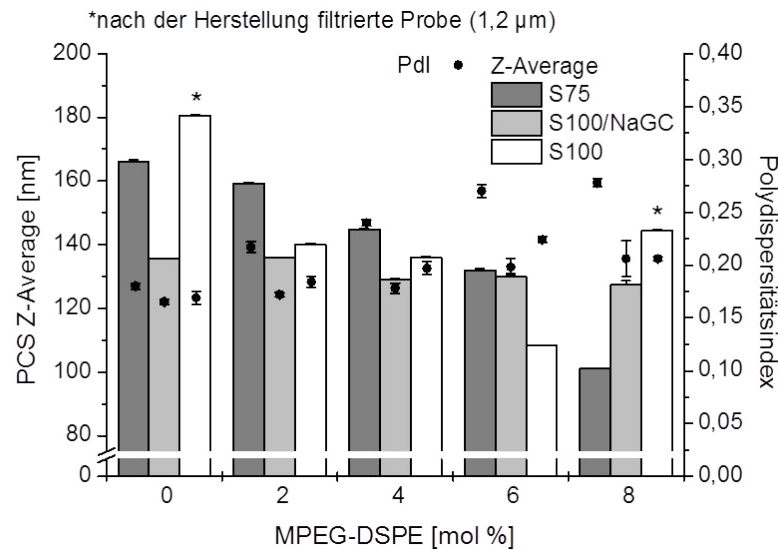


Abbildung 4.1: PCS *Z-Average* und PDI-Werte der Dispersionen stabilisiert mit S100, S100/NaGC oder S75 und steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE gemessen direkt nach der Herstellung.

4.1.1 Einfluss der PEGylierung auf die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

Die mittels Hochdruck-Schmelzhomogenisation hergestellten Dispersionen besaßen in der Regel ein makroskopisch homogenes Aussehen. Vereinzelt wurden Cholesterylmyristat-Flocken, die wahrscheinlich am Auslass-Ventil des Homogenisators auskristallisiert waren, mittels Filtration durch einen Glasfaserfilter (1,2 µm, Whatmann, UK-Maidstone) entfernt. Hiervon waren nur die allein mit S100 stabilisierte Probe betroffen und die Probe S100/8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE. Für die Dispersionen wurden mittlere Partikelgrößen-durchmesser (PCS *Z-Average*) von ca. 100-180 nm mit Polydispersitätsindizes zwischen 0,17 und 0,28 erreicht (Abbildung 4.1). Diese Partikelgrößen liegen in dem geeigneten Bereich von ungefähr 120 bis 200 nm, um eine verlängerte Zirkulationszeit der Partikel im Blut zu erzielen, da sie so der Filtration in der Milz oder der Akkumulation in der Leber entgehen [9]. Aufgrund der zusätzlich emulgierenden Wirkung von MPEG₂₀₀₀-DSPE wurden die Partikelgrößen in den MPEG₂₀₀₀-DSPE-haltigen Proben im Vergleich zu den nicht-PEGylierten Proben kleiner. Die Partikelgröße scheint mit zunehmender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration abzunehmen. Die Reduktion trat deutlich stärker in den Systemen auf, die ausschließlich mit Phospholipiden stabilisiert wurden (mit Ausnahme der Probe S100/8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE), als in den Dispersionen stabilisiert mit S100/NaGC, für die nur eine geringe Abnahme der Partikelgröße beobachtet werden konnte. Es ist aber zu beachten, dass die mit S100/NaGC stabilisierten Partikel bereits einen kleineren *Z-Average*-Durchmesser aufgrund des zusätzlichen Stabilisators aufwiesen. Der geringere

Effekt des MPEG₂₀₀₀-DSPE auf die Partikelgröße könnte möglicherweise auf eine Interaktion des NaGC mit dem MPEG₂₀₀₀-DSPE zurückzuführen sein. Der Polydispersitätsindex nahm mit steigendem MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt zu und deutet auf eine eher breite Partikelgrößenverteilung in Dispersionen mit höherem MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt hin. Die intensitätsgewichtete PCS Partikelgrößenverteilung zeigte für stärker MPEG₂₀₀₀-DSPE-haltige Proben eine Zunahme einer Fraktion kleiner Partikel im Bereich von 15-60 nm (Abbildung 4.2). Diese Fraktion an kleinen Partikeln resultiert wahrscheinlich aus der Bildung von

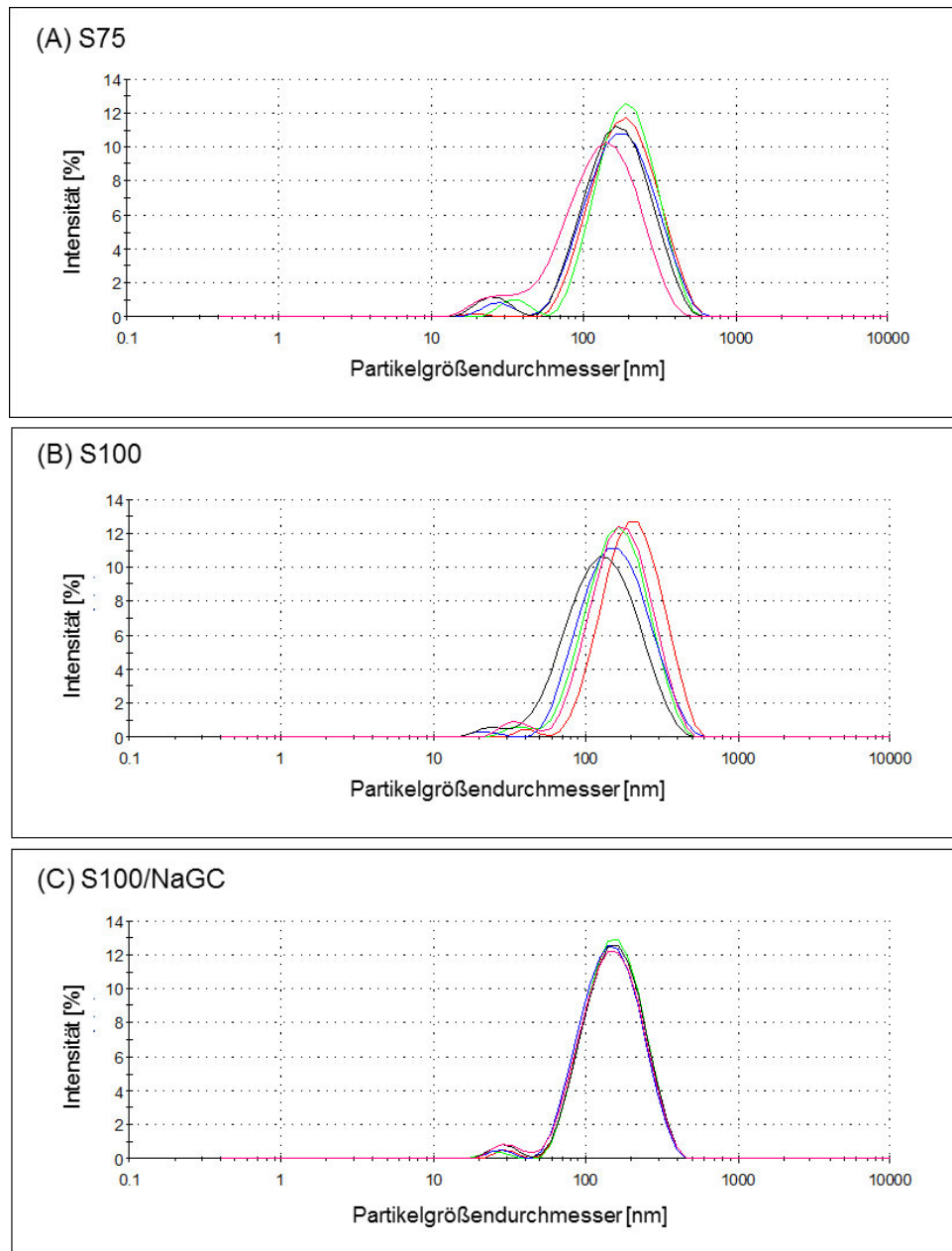


Abbildung 4.2: Intensitätsgewichtete PCS-Partikelgrößenverteilung der Dispersionen stabilisiert mit S75 (A), S100 (B) oder S100/NaGC (C) und steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE (rot: 0 mol%, grün: 2 mol%, blau: 4 mol%, schwarz: 6 mol%, rosa: 8 mol%).

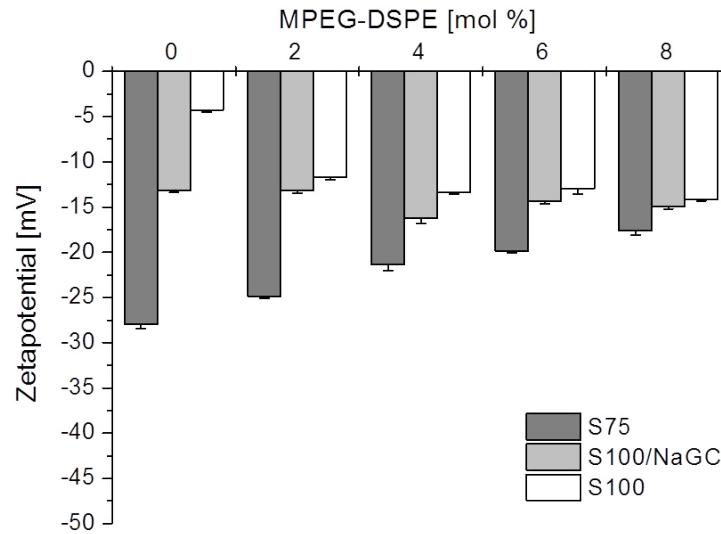


Abbildung 4.3: Zetapotential-Werte der Dispersionen stabilisiert mit S100, S100/NaGC oder S75 und steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE gemessen direkt nach der Herstellung.

Vesikeln und/oder Mischmizellen in der wässrigen Phase. Da die Partikelgrößenverteilung keine Anzeichen für die Anwesenheit von Partikeln im Mikrometerbereich enthielt, kann die Zunahme des Polydispersitätsindex auf die Entstehung der zusätzlichen kolloidalen Strukturen in der wässrigen Phase zurückgeführt werden.

4.1.2 Einfluss der PEGylierung auf das Zetapotential

Um einen Hinweis auf die PEGylierung zu erhalten, wurde das Zetapotential der Dispersionen bestimmt (Abbildung 4.3), da durch die PEG-Umhüllung die Oberflächenladung der Partikel abgeschirmt werden sollte. Die PEG-Ketten vergrößern den Abstand zwischen der Partikeloberfläche und der Scherebene, wodurch es zu einer Abnahme des Zetapotentialbetrages kommt [77, 78]. Partikel, die ausschließlich mit S100 stabilisiert wurden, zeigten aufgrund des hohen Reinheitsgrades dieses Sojabohnen-Phospholipids nur ein geringes negatives Zetapotential ($-4,3 \pm 0,2$ mV), wohingegen die Stabilisation mit dem weniger gereinigten S75 in einem negativeren Zetapotential resultierte ($-28 \pm 0,4$ mV). Das Hinzufügen von NaGC zu S100 hatte nur eine leichte Zunahme des Zetapotentialbetrages verglichen mit den nur mit S100 stabilisierten Partikeln zur Folge ($-13,2 \pm 0,2$ mV). In den S75-haltigen Dispersionen sank mit zunehmenden MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt der Wert des Zetapotentials von -28 mV auf -18 mV, wodurch deutlich wurde, dass die negative Oberflächenladung tatsächlich durch die PEG-Ketten abgeschirmt wird. Dagegen zeigten die S100-stabilisierten Systeme einen leichten Anstieg des Zetapotentialbetrages mit

steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration. Da das Zetapotential der S100-stabilisierten Dispersion ohne MPEG₂₀₀₀-DSPE nahe bei 0 mV lag, war bei einer Oberflächenmodifikation mit MPEG₂₀₀₀-DSPE ein abschirmender Effekt der PEG-Ketten nicht erkennbar. Die Zunahme des Zetapotentialbetrages mit steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration erfolgt sehr wahrscheinlich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppe des MPEG₂₀₀₀-DSPE [77]. Bei den Dispersionen, die mit der Kombination aus S100 und NaGC stabilisiert waren, konnte keine eindeutige Veränderung des Zetapotentials detektiert werden. Einerseits würde die Zugabe von steigenden Mengen an negativ geladenem MPEG₂₀₀₀-DSPE den Betrag des Zetapotentials erwartungsgemäß erhöhen, andererseits sollte aber auch der abschirmende Effekt stärker werden, so dass es wahrscheinlich zu einer Kompensation beider Effekte kommt.

4.1.3 Einfluss der PEGylierung auf das Phasenverhalten

Alle untersuchten Stabilisatorsysteme ohne MPEG₂₀₀₀-DSPE führten zum typischen Phasenverhalten von Phospholipid-stabilisierten unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Da die Einführung von MPEG₂₀₀₀-DSPE in die Partikeloberflächenschicht zu einer Veränderung des Phasenverhaltens führen könnte, wurde dieses auf einen möglichen Einfluss des PEGylierten Phospholipids untersucht. Einerseits ist das Kristallisationsverhalten abhängig vom Stabilisatorsystem [56] und könnte daher durch das MPEG₂₀₀₀-DSPE beeinflusst werden, andererseits wären auch Veränderungen der flüssigkristallinen Übergänge nicht unerwartet, da diese Übergänge ebenfalls empfindlich gegenüber Veränderungen in der Zusammensetzung der Dispersion sind [7].

Für alle untersuchten Stabilisatorsysteme wurde ein ähnlicher Einfluss eines zunehmenden MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalts auf die Kristallisation beobachtet (Abbildung 4.4). Das Hauptkristallisationsereignis verschob sich leicht zu höheren Temperaturen und die Fläche des kleinen Peaks bei höheren Temperaturen nahm ab. Die Abnahme des Peaks bei höheren Temperaturen mit steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Partikelgröße abnimmt [56]. Eine kleinere Partikelgröße kann durch den steigenden MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt und der somit höheren Emulgator-Konzentration bedingt sein. Nur die mit S100 stabilisierte Probe mit 8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE wies eine größere Partikelgröße auf und demzufolge nahm die Peakfläche bei höheren Temperaturen zu. Die Position des Hauptkristallisationsereignisses wird nur sehr gering durch die Partikelgröße beeinflusst. Diese ist hauptsächlich abhängig von der Art und der Konzentration des Stabilisatorsystems, der thermischen Vorbehandlung und dem Alter der Proben [56]. Hier konnte eine leichte Verschiebung des Hauptkristallisationsereignisses mit steigender

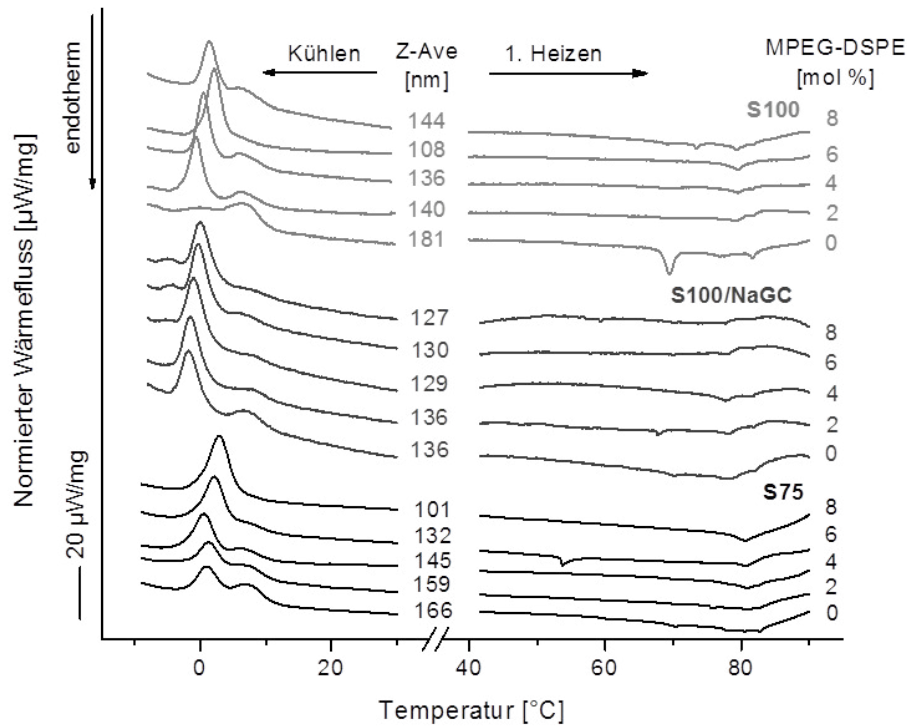


Abbildung 4.4: DSC-Kurven der Cholesterylmyristat-Nanodispersionen nach der Herstellung. Die Proben wurden erhitzt (rechts) und anschließend abgekühlt (links). Von den Abkühlkurven ist nur der Temperaturbereich, der das Kristallisationsereignis enthält, dargestellt. Die PCS *Z-Average*-Partikelgrößen der jeweiligen Proben sind ebenfalls angegeben.

MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration festgestellt werden, welche durch eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung in der Emulgatorschicht hervorgerufen worden sein könnte. Im Gegensatz zu dem Phosphatidylcholin in Lipoid S100 und S75 enthält ein MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekül nur gesättigte Fettsäureketten, die einen höheren Schmelzpunkt aufweisen als ungesättigte, und könnte daher eine Verschiebung des Hauptkristallisationsereignisses zu höheren Temperaturen hervorrufen. Eine Verschiebung der Kristallisationstemperatur zu höheren Temperaturen wurde bereits von Bunjes et al. bei Triglycerid-Nanopartikeln, stabilisiert mit gesättigten Phospholipiden im Vergleich zu ungesättigten Phospholipiden, beobachtet [129]. Die Einführung von MPEG₂₀₀₀-DSPE äußerte sich zudem in Form einer Veränderung der flüssigkristallinen Übergänge. Mit zunehmenden MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt wurden beide flüssigkristallinen Übergänge undeutlicher und schoben sich ineinander (Abbildung 4.4).

Beim Aufheizen der frisch hergestellten Proben zeigte nur die ausschließlich mit S100 stabilisierte Dispersion einen deutlichen Schmelzübergang von auskristallisiertem Choles-

terylmyristat (bei ca. 68 °C). Kein kristallines Cholesterylmyristat konnte dagegen in den Dispersionen, die S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE enthielten, detektiert werden, was auf eine höhere Stabilität gegenüber Rekristallisation durch die PEGylierung hinweist.

4.1.4 Rekristallisationstendenz während der Lagerung

Da der smektische Zustand der Partikel metastabil ist, kann es während der Lagerung zur Rekristallisation des Cholesterylmyristats kommen. Die Rekristallisationstendenz hängt dabei vom verwendeten Stabilisatorsystem und der Partikelgröße ab [56]. Größere Partikel zeigen eine größere Rekristallisationstendenz als kleinere Partikel und Cholesterylmyristat-Nanopartikel, die einen Stabilisator mit einer Fettsäuregruppe enthalten (z.B. Phospholipide) besitzen normalerweise ein bimodales Kristallisationsverhalten und eine vergleichsweise höhere Rekristallisationstendenz bei der Lagerung als mit Polymeren stabilisierte Systeme [7]. Das eingesetzte MPEG₂₀₀₀-DSPE besitzt sowohl Fettsäuregruppen als auch eine Polymerkette, daher sollte untersucht werden, welchen Einfluss die PEGylierung auf die Rekristallisation während der Lagerung hat. Die Dispersionen wurden nach einer Lagerung von einem Monat untersucht, da ein längerer Lagerungszeitraum hinsichtlich zusätzlicher störender Einflüsse auf die Rekristallisation wie z.B. chemische Instabilitäten bei diesen Systemen nicht sinnvoll ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Zusatz von MPEG₂₀₀₀-DSPE die Rekristallisationstendenz reduzierte, da die gelagerten MPEG₂₀₀₀-DSPE-haltigen Proben weniger rekristallisiertes Cholesterylmyristat enthielten als die Dispersionen ohne MPEG₂₀₀₀-DSPE (Abbildung 4.5A). Allerdings muss beachtet werden, dass die Rekristallisationstendenz von Phospholipid-haltigen Cholesterylmyristat-Dispersionen stark von der Partikelgröße abhängt [56]. Wie in Abbildung 4.5B gezeigt wird, nahm die Konzentration an rekristallisiertem Cholesterylmyristat in den mit S75 stabilisierten Systemen mit der Partikelgröße zu und mit steigendem MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt ab. Daher ist es schwierig, zwischen dem Einfluss der Partikelgröße und einem möglichen Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE an der Oberfläche der Partikel zu differenzieren. Diese Effekte wurden auch für die anderen beiden Stabilisatorsysteme beobachtet. In den mit S100/NaGC stabilisierten Systemen war die Reduktion der Rekristallisationstendenz mit steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration viel ausgeprägter als die Abnahme der Partikelgröße. Dies deutet auf einen Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE als „Substanz“ auf die Rekristallisation hin (Abbildung 4.5C). Außerdem wies die Probe mit 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE trotz größerer Partikelgröße weniger rekristallisiertes Cholesterylmyristat auf als die Probe ohne MPEG₂₀₀₀-DSPE. Eine weitere Ausnahme stellte die Probe stabilisiert mit S100/8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (Abbildung 4.5D) dar. In diesem Fall war die Partikelgröße wieder größer und die Kon-

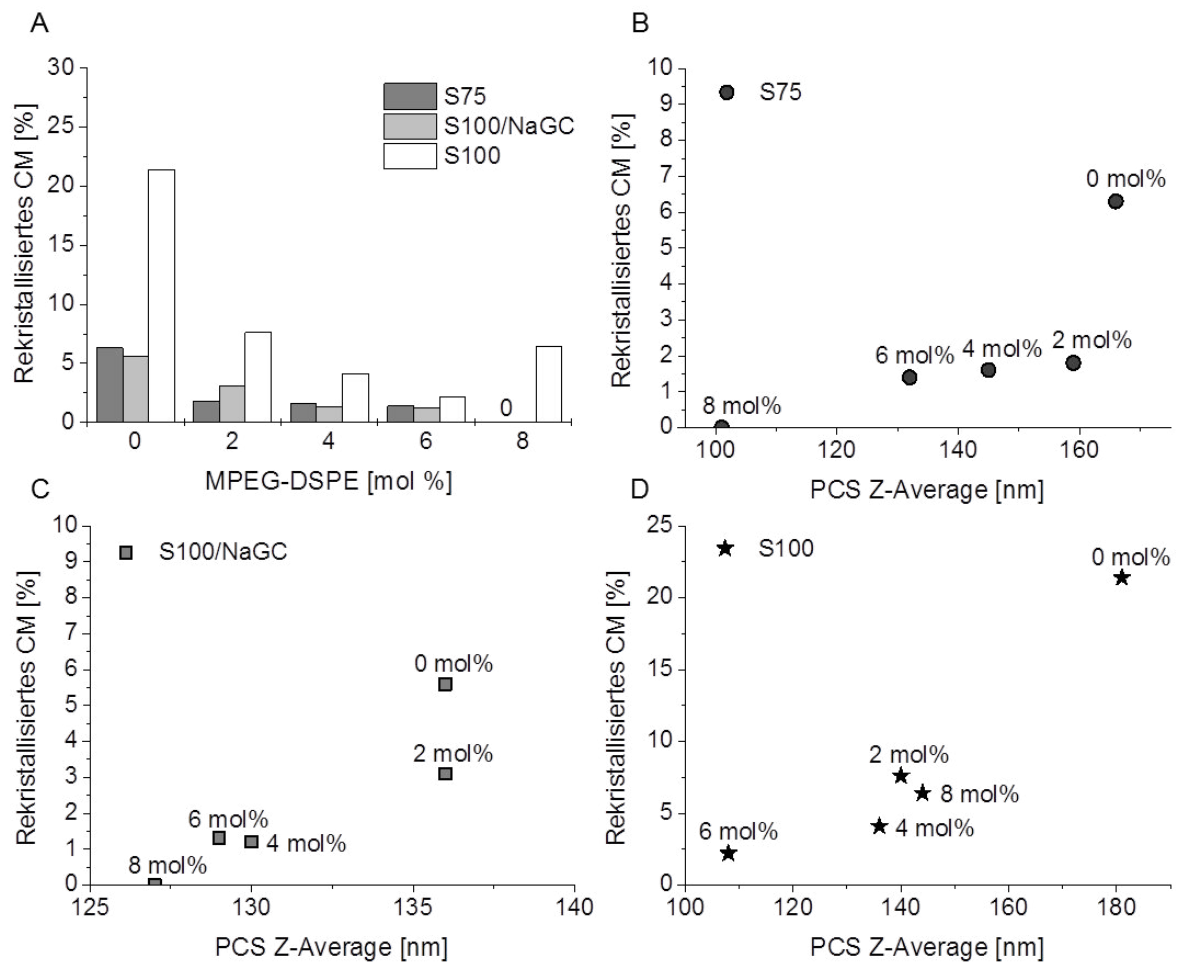


Abbildung 4.5: Menge an rekristallisiertem Cholesterylmyristat nach einem Monat Lagerung in Abhängigkeit von der MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration (A) und der Partikelgröße der unterschiedlich stabilisierten Nanopartikel (B-D). Die Angabe in mol% bezieht sich auf die Konzentration an MPEG₂₀₀₀-DSPE. Es ist zu beachten, dass die Achsen unterschiedlich skaliert sind.

zentration an rekristallisiertem Cholesterylmyristat geringer verglichen mit der Probe mit S100/2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Einfluss von MPEG₂₀₀₀-DSPE auf die Rekristallisationstendenz getrennt von dem Effekt der Partikelgröße zu untersuchen. Ein Ansatz wäre z.B. die Herstellung von Partikeln mit gleicher Größe, aber mit unterschiedlichem MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt. In der Praxis ist dies allerdings mittels Hochdruckhomogenisation schwer zu realisieren. Eine Alternative könnte die nachträgliche PEGylierung darstellen, bei der Partikel einer Charge mit unterschiedlichen Konzentrationen einer mizellaren MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung inkubiert werden [130, 131]. Diese Möglichkeit wird in Abschnitt 4.3 beschrieben.

Ähnliche Effekte wie bei den PEGylierten Partikeln, z.B. eine bimodale Kristallisation und eine hohe Stabilität gegenüber Rekristallisation trotz einer Fettsäurekette im Molekül, wurden bereits für mit Polysorbat 80 (Macrogolsorbitanoleat) stabilisierte Systeme

berichtet [7]. Polysorbat 80 enthält ebenfalls eine Fettsäuregruppe und Polymerketten. Als Erklärung wurde ein Einfluss der polaren Polyethylenglykol-Ketten auf die Rekristallisationstendenz diskutiert. Es wurde vorgeschlagen, dass die voluminöse hydrophile Kopfgruppe die Transformation von kugelförmigen in die stabileren zylinderförmigen Partikel erleichtert. Ein Hinweis auf ein hauptsächliches Vorkommen von zylinderförmigen Partikeln stellte die Beobachtung dar, dass bei diesen Systemen eine bimodale Kristallisation nur beim Kühlen der frisch aufgeschmolzenen Partikel auftrat und dass bei der Cryo-Elektronenmikroskopie keine stark instabilen Partikel detektiert wurden [7]. Bei den mit MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Systemen ist vermutlich ebenfalls eine Tendenz zum Vorkommen vorwiegend zylinderförmiger Partikel zu erkennen, da die bimodale Kristallisation bei den PEGylierten Partikeln viel geringer als bei den nicht-PEGylierten Partikeln ausgeprägt oder sogar nur monomodal ist (siehe Abbildung 4.4). Dies könnte ein weiterer Hinweis für den Einfluss der hydrophilen Polyethylenglykol-Ketten auf die erleichterte Transformation in die stabileren zylinderförmigen Partikeln sein. Kunt-sche et al. vermuteten, dass bei rein Polymer-stabilisierten Systemen (PVA, Poloxamer) oder NaGC-stabilisierten Systemen, die eine monomodale Kristallisation und eine geringe Rekristallisationstendenz zeigen, die hydrophoben Teile der Stabilisatoren weniger stark an die Oberfläche binden als z.B. bei Phospholipiden und somit eine Reorganisation der Stabilisatormoleküle an der Oberfläche bei der Transformation erleichtert ist. Für Polysorbat 80 und MPEG₂₀₀₀-DSPE wäre es denkbar, dass die Fettsäurereste aufgrund der voluminösen hydrophilen Polyethylenglykol-Ketten weniger tief in der Oberflächenschicht der Partikel verankert sind und daher die Transformation ebenfalls erleichtert sein könnte im Vergleich zu mit reinen Phospholipiden stabilisierten Partikeln. Ein Ansatz zur Aufklärung des Stabilisator-Einflusses auf die Partikelform könnte hier die Trennung von kugelförmigen, zylinderförmigen und anderen co-existierenden kolloidale Strukturen in den Systemen durch asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung und anschließende getrennte Analyse darstellen [7].

4.1.5 Stabilitätsuntersuchungen unter Stressbedingungen

Um weitere Hinweise auf eine erfolgreiche PEGylierung zu erhalten, wurde die Stabilität der Systeme unter Stressbedingungen (Zusatz von Elektrolyt, unterschiedliche pH-Werte, Autoklavierung) untersucht. Da eine PEGylierung zu einer sterischen Stabilisierung der Partikel führt, sollten die entsprechenden Dispersionen selbst unter Bedingungen mit unzureichender elektrostatischer Stabilisierung stabil bleiben. Eine elektrostatische Stabilisierung kann durch Zugabe von Elektrolyten, bedingt durch die Abnahme der Dicke der

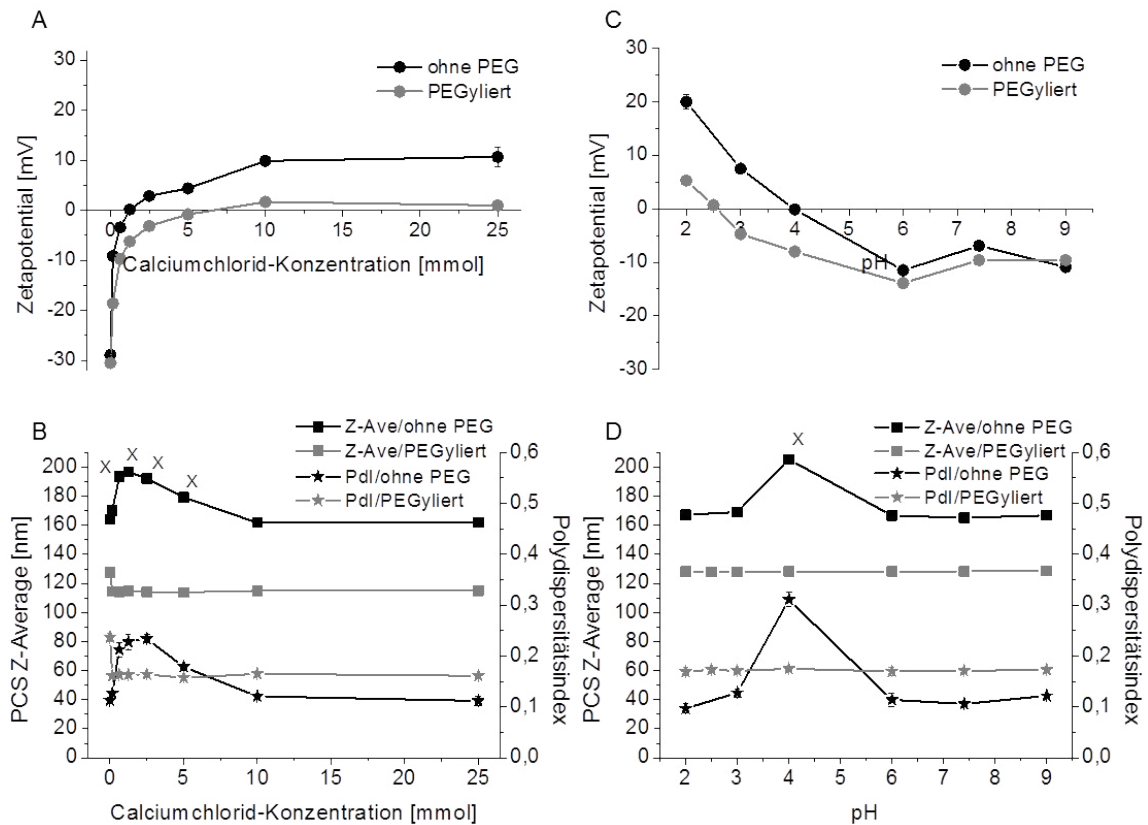


Abbildung 4.6: Zetapotential (A) und Z-Average-Durchmesser/Polydispersitätsindex (B) von Dispersionen PEGylierter und nicht-PEGylierter Partikel (stabilisiert mit S100 oder S100/6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE) mit unterschiedlichen CaCl₂-Konzentrationen. Abhängigkeit des Zetapotentials (C) und des Z-Average-Durchmessers/Polydispersitätsindex (D) vom pH-Wert der gleichen PEGylierter und nicht-PEGylierter Partikel. Die Symbole wurden zur besseren Veranschaulichung verbunden. „X“ kennzeichnet die Anwesenheit von Partikeln im Mikrometerbereich. Zu beachten ist, dass der Zetapotential-Wert der Probe mit 0 mmol CaCl₂ in hochgereinigtem Wasser mit einer niedrigen Konduktivität (0,056 µS/cm) gemessen wurde, weshalb die hier genannten Werte von den in TRIS-Puffer gemessenen (Abbildung 4.3) abweichen.

diffusen Doppelschicht mit steigender Elektrolyt-Konzentration, oder durch Einstellung des pH-Wertes des Systems auf den Wert, an dem der Ladungsnullpunkt (*point of zero charge*) erreicht ist, minimiert werden [25].

Für die Elektrolyt- und pH-Stabilitätsuntersuchungen wurden zwei Proben ausgewählt, eine Dispersion ausschließlich stabilisiert mit S100 als Kontrollprobe und eine Dispersion stabilisiert mit S100/6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE als PEGylierte Probe.

Die Zetapotential-Werte dieser Proben in hochgereinigtem Wasser ohne Calciumchlorid liegen bei -29 mV für die nicht-PEGylierte und bei -31 mV für die PEGylierte Probe (Abbildung 4.6A). Es ist zu beachten, dass diese Zetapotential-Werte in hochgereinigtem Wasser mit einer niedrigeren Konduktivität gemessen wurden und daher von den Werten, die in TRIS-Puffer erhalten wurden (Abbildung 4.3), abweichen. Die Zugabe von Calciumchlorid zur Kontrollprobe führte zu einer Abnahme des negativen Zetapoten-

als, bis der Ladungsnullpunkt bei einer Calciumchlorid-Konzentration von ca. 1,25 mmol (Abbildung 4.6A) erreicht wurde. Oberhalb von 1,25 mmol kam es zur Ladungsumkehr und das positive Zetapotential nahm mit steigender Calciumchlorid-Konzentration zu. Durch spezifische Interaktion der Calciumionen mit der Phosphatgruppe des Phospholipids kommt es zur Bindung von Calciumionen an die Oberfläche [25]. Die Reduktion des Zetapotentials führte zu schwächeren abstoßenden Kräften. An einem bestimmten Punkt überwiegen die anziehenden Van-der-Waals-Kräfte diese und es konnte bis zum Ladungsnullpunkt ein Partikelwachstum in den PCS-Messungen beobachtet werden (Abbildung 4.6B). An dem Punkt, an dem das Zetapotential positiv wurde, erlangte das System wieder stärkere abstoßende Kräfte und *Z-Average* und Polydispersitätsindex nahmen ab. Um den Ladungsnullpunkt herum wurden vom PCS-Gerät Partikel im Mikrometerbereich detektiert. Im Gegensatz zu der Kontrolldispersion trat bei den PEGylierten Proben keine Instabilität auf. Außer eines leichten Abfalls des *Z-Average* und des Polydispersitätsindex bei Zugabe von Calciumchlorid, möglicherweise verursacht durch Dehydratisierung der MPEG₂₀₀₀-DSPE-Ketten, blieben die Werte über den untersuchten Konzentrationsbereich unverändert (Abbildung 4.6B). Obwohl die Elektrolytzugabe das Zetapotential der PEGylierten Probe auf null reduzierte, sorgte das MPEG₂₀₀₀-DSPE für eine ausreichende sterische Stabilisierung der Partikel. Interessanterweise konnte für die PEGylierte Probe keine Ladungsumkehr beobachtet werden (Abbildung 4.6A). Die PEG-Ketten scheinen die Partikeloberfläche abzuschirmen und die spezifische Interaktion von Calciumionen und Phospholipid zu verhindern.

Betrachtet man die Stabilität der Partikel bei unterschiedlichen pH-Werten, waren die Effekte ähnlich (Abbildung 4.6C, D). Bei einem bestimmten pH-Wert wurde das Zetapotential der Partikel neutralisiert und die Partikel verloren ihre elektrostatische Stabilisierung. Nur sterisch stabilisierte Partikel blieben dabei stabil. Die Kontrollprobe zeigte einen Ladungsnullpunkt in der Nähe von pH 4, an dem die Dispersion instabil wurde. Der *Z-Average* und der Polydispersitätsindex nahmen zu und Partikel im Mikrometerbereich wurden detektiert. Der Ladungsnullpunkt der PEGylierten Dispersion war in die Nähe von pH 2,5 verschoben und die Abnahme des Zetapotentials war niedriger als in der Kontrollprobe. Unterhalb des Ladungsnullpunktes wurde das Zetapotential durch die Protonierung der Phosphatgruppe der Phospholipide umgekehrt. Sogar am Ladungsnullpunkt blieb die PEGylierte Probe stabil und belegt somit die sterische Stabilisierung der Partikel.

Ein möglicher Nachteil einer sterischen Stabilisierung ist, dass während des Autoklavierens Probleme auftreten können. Eine sterische Stabilisierung kann verloren gehen, wenn während des Autoklavierens der Trübungspunkt des Stabilisators überschritten wird. Der Trübungspunkt eines Stabilisators in wässriger Lösung ist die Temperatur, bei der die Po-

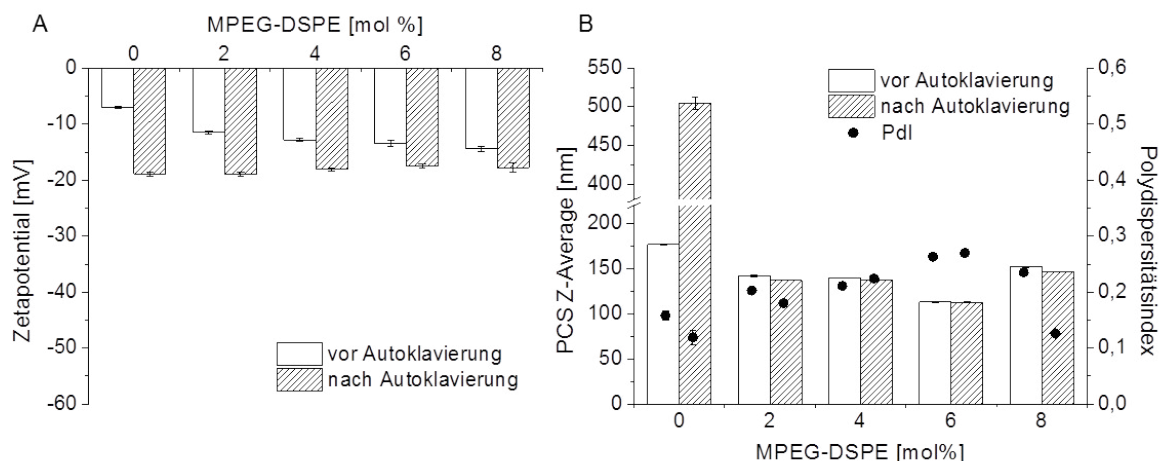


Abbildung 4.7: Zetapotential (A) und Z-Average-Durchmesser/Polydispersitätsindex (B) vor und nach dem Autoklavieren (ermittelt nach einer Woche Lagerung) der mit S100 und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Cholesterylmyristat-Nanopartikel. Die Zetapotential-Messungen wurden in TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) durchgeführt.

lymerketten durch Dehydratisierung der Polyoxyethylen-Gruppen kollabieren [132]. Eine Instabilität der autoklavierten Proben könnte daher einen weiteren Hinweis auf die erfolgreiche PEGylierung darstellen. Andererseits kann trotz erfolgreicher PEGylierung auch keine Instabilität auftreten, wenn der Trübungspunkt des MPEG₂₀₀₀-DSPE über 121 °C liegt oder noch andere Faktoren (z.B. Zetapotential) zur Stabilität beitragen. In Hinblick auf die Eignung der Dispersionen für die parenterale Anwendung wäre die Stabilität beim Autoklavieren ein weiterer vorteilhafter Aspekt.

Die Untersuchung der Stabilität beim Autoklavieren wurde mit Proben, die mit S100 und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisiert waren, durchgeführt. Anteile dieser Dispersionen wurden nach einwöchiger Lagerung autoklaviert. Um physikalische Instabilitäten durch den Stress beim Autoklavieren zu vermeiden, muss die elektrostatische bzw. sterische Abstoßung zwischen den Partikeln groß genug sein.

Betrachtet man das Zetapotential der ausschließlich mit S100 stabilisierten Dispersion, ist die elektrostatische Stabilisierung sehr gering (Abbildung 4.7A). Daher könnte die Einführung der hydrophilen PEG-Ketten des MPEG₂₀₀₀-DSPE zu einer sterischen Stabilisation beim Autoklavieren führen, vorausgesetzt, dass der Trübungspunkt des MPEG₂₀₀₀-DSPE über der Temperatur von 121 °C liegt. Nach dem Sterilisationsprozess konnten keine makroskopischen Veränderungen des Aussehens der Dispersionen festgestellt werden. PCS-Messungen vor und nach dem Autoklavieren (Abbildung 4.7B) ließen erkennen, dass alle MPEG₂₀₀₀-DSPE-haltigen Proben stabil blieben. Die allein mit S100 stabilisierte Probe dagegen war aufgrund unzureichender Stabilisierung instabil. Der Zusatz von PEGyliertem Phospholipid scheint zu sterisch stabilisierten Partikeln zu führen, sogar

Tabelle 4.1: Zetapotential, *Z-Average*-Durchmesser und Polydispersitätsindex vor und nach dem Autoklavieren der mit S100 und 6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten und mit 5 mM CaCl₂-Lsg. oder Phosphatpuffer pH 2,5 verdünnten Probe.

Probe	Zetapotential [mV]	Z-Average [nm]	PdI
S100/6 mol% MPEG ₂₀₀₀ -DSPE + 5 mM CaCl ₂ -Lsg.	-0,8 ± 0,2	113,8 ± 0,2	0,157 ± 0,005
S100/6 mol% MPEG ₂₀₀₀ -DSPE + 5 mM CaCl ₂ -Lsg., autoklaviert	-2,2 ± 0,1	115,8 ± 0,5	0,137 ± 0,004
S100/6 mol% MPEG ₂₀₀₀ -DSPE + Phosphatpuffer pH 2,5	0,7 ± 0,5	127,9 ± 0,1	0,173 ± 0,005
S100/6 mol% MPEG ₂₀₀₀ -DSPE + Phosphatpuffer pH 2,5, autoklaviert	-5,2 ± 0,6	118,2 ± 0,1	0,121 ± 0,002

unter Verwendung von so niedrigen Konzentrationen wie 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Temperatur während des Autoklavierens nicht den Trübungspunkt des MPEG₂₀₀₀-DSPE erreicht. Das Autoklavieren verursachte allerdings einen Anstieg des negativen Zetapotentials, welches auf eine teilweise Hydrolyse der Phospholipide hinweist. Dieser Anstieg könnte auch zu der Stabilisierung der PEGylierten Partikel beigetragen haben. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde der Autoklaviervorgang mit sterisch stabilisierten Proben, die ein Zetapotential von 0 mV aufwiesen, wiederholt. Dazu wurde das Zetapotential der mit S100/6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Probe durch Verdünnung mit 5 mM Calciumchlorid-Lösung bzw. in Phosphatpuffer mit einem pH von 2,5 neutralisiert. Beide Proben blieben beim anschließenden Autoklavieren stabil, was die sterische Stabilisierung durch die PEGylierung belegte (Tabelle 4.1).

4.1.6 Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie

Die bisher dargestellten Ergebnisse belegen indirekt die Anwesenheit von MPEG₂₀₀₀-DSPE auf der Partikeloberfläche. Um das MPEG₂₀₀₀-DSPE an der Oberfläche der Partikel direkt nachzuweisen und um das Ausmaß der PEGylierung abzuschätzen, wurden ¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Hierfür wurde eine höher konzentrierte Probe (5% CM, 3,2% Lipoid S100, 6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE; Z-Ave 146,8 ± 0,4 nm, PdI 0,259 ± 0,003) ausgewählt. Da ein Überschuss an vesikelbildenden Phospholipiden in der wässrigen Phase der Dispersion zu erwarten war [1], die nicht mitdetektiert werden sollten, wurden die PEGylierten Partikel mittels Ultrazentrifugation von der wässrigen Phase abgetrennt und anschließend wieder in Wasser redispergiert. Die Stabilität der redispergierten Partikel wurde mittels PCS bestätigt (Z-Ave 166,9 ± 0,2 nm, PdI 0,096 ± 0,010). Durch die

Abtrennung der Fraktion kleinerer Strukturen wurde der *Z-Average* etwas größer und der Pdl viel kleiner. Die ^1H -NMR-Spektren der separierten PEGylierten Partikel und der Referenzsysteme (Originaldispersion der PEGylierten Cholesterylmyristat-Partikel, wässrige Dispersion von Lipoid S100, wässrige mizellare Lösung von MPEG₂₀₀₀-DSPE, Lösung von Cholesterylmyristat) sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Die ^1H -NMR-Signale wurden entsprechend der Literatur [36, 133, 134] und anhand der Referenz-Spektren zugeordnet. In der Cholesterylmyristat-Dispersion konnten aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit und der kurzen Relaxationszeit des Cholesterylmyristats im smektischen Zustand keine zum Cholesterylmyristat gehörenden Signale detektiert werden. In Folge der hohen Viskosität der smektischen Phase besitzen die Cholesterylmyristat-Partikel einen eher festen Charakter [1].

Die Signale in den Spektren können Lipoid S100 (Abbildung 4.8A), MPEG₂₀₀₀-DSPE (Abbildung 4.8B) und Ethanol zugeordnet werden. Das Signal bei 0,9 ppm (a) ist typisch für die Methyl-Protonen und das Signal bei 1,3 ppm (b) für die Methylen-Protonen der Fettsäurekette in den Phospholipiden. Der ppm-Wert der Methylen-Protonen der PEG-Kette (g, 3,7 ppm) wie auch der Wert für die Methyl-Protonen der Methoxy-Gruppe am Ende der PEG-Kette (f, 3,4 ppm) waren aufgrund des benachbarten Sauerstoffs zu höheren Werten verschoben. Das Signal der Methyl-Protonen der Cholin-Gruppe in den Phospholipiden (e) lag bei 3,3 ppm. Die Beobachtung von scharfen Signalen aufgrund der Anwesenheit von Ethanol zeigte, dass das Lösungsmittel, welches für die Herstellung der Phospholipidfilme verwendet wurde, nicht vollständig mittels Vakuum-Rotationsverdampfung entfernt werden konnte. Daher ist in den Spektren D und F ein Quartett für die Methyl-Protonen bei 3,6 ppm und ein Triplett für die Methylen-Protonen bei 1,2 ppm zu erkennen. Die Anwesenheit der Signale der PEG-Kette ($-\text{O}-\text{CH}_3$ und $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) in dem ^1H -NMR-Spektrum der separierten Partikel (Abbildung 4.8D) liefert den direkten Nachweis, dass das MPEG₂₀₀₀-DSPE auf der Partikeloberfläche lokalisiert ist. Das Verhältnis der integrierten Signale bei 3,7 ppm ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, ohne Ethanol-Signal), 3,4 ppm ($-\text{O}-\text{CH}_3$) und 3,3 ppm ($-\text{N}^+- (\text{CH}_3)_3$) war 151 : 5 : 100 ($\approx 30,2 : 1 : 20$) für die Original-Dispersion (Abbildung 4.8F). Dies Verhältnis stimmt mit dem einer entsprechenden wässrigen Dispersion aus Lipoid S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE überein. Für die separierten Partikel (Abbildung 4.8D) wurde ein ähnliches Verhältnis von 140 : 4 : 100 ($\approx 35 : 1 : 25$) gefunden. Das Verhältnis von S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE an der Partikeloberfläche scheint daher nur geringfügig von dem abzuweichen, welches bei der Herstellung der Dispersionen eingesetzt wurde. Die beobachtete leicht geringere relative Intensität der zum PEG gehörenden Signale bei den separierten Partikeln könnte auf eine gewisse Tendenz der PEGylierten Phospholipide, sich in die Wasserphase zu verteilen, oder auf eine Immobilisierung einer gewissen Fraktion hinweisen. Des Weiteren wird durch die Ultrazentri-

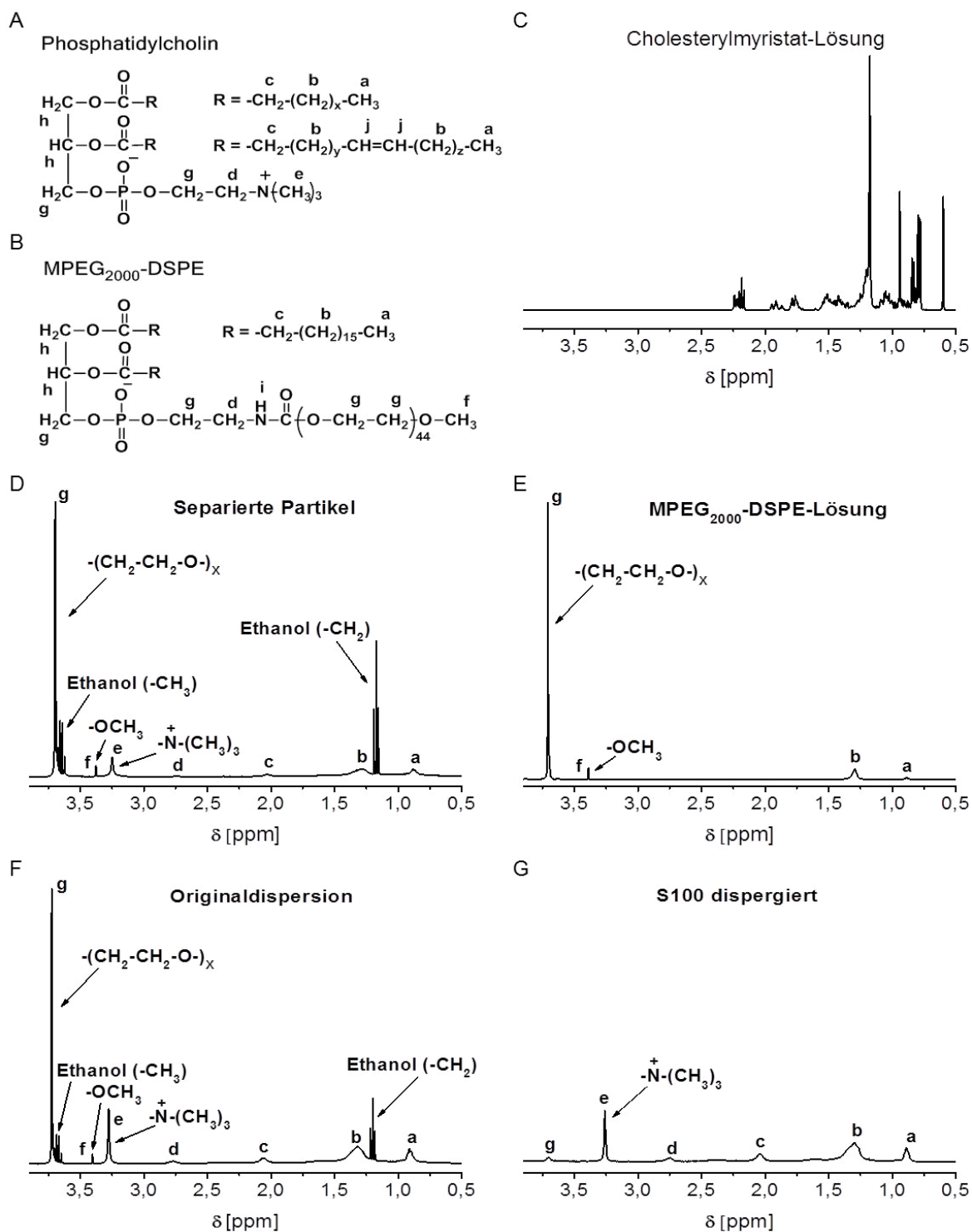


Abbildung 4.8: ^1H -NMR-Spektren der separierten PEGylierten Partikel stabilisiert mit S100/6 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (D) und der Referenzsysteme (C, E-G). Alle Signale sind entsprechend der Position der jeweiligen Protonen in den Strukturformeln von Phosphatidylcholin (A) und MPEG₂₀₀₀-DSPE (B) markiert.

fugation keine vollständige Abtrennung der Partikel erreicht. Eine geringe Fraktion an kleineren PEGylierten Partikeln verbleibt mit den Liposomen im Unterstand, so dass ein Teil des MPEG₂₀₀₀-DSPE durch den Zentrifugationsvorgang verloren geht. Auffällig ist, dass das aus den NMR-Spektren erhaltene Verhältnis an Phosphatidylcholin-Molekülen zu MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekülen nicht mit dem theoretischen Verhältnis (16,7 : 1) der eingesetzten Mengen an Lipoid S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE übereinstimmt. Schaut man sich das Verhältnis der integrierten Signale bei 3,3 ppm und 3,4 ppm an und berücksichtigt, dass die Methoxy-Gruppe drei äquivalente Protonen und die Cholin-Gruppe neun äquivalente Protonen enthält, liegt das Verhältnis an Phosphatidylcholin-Molekülen zu MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekülen in der Original-Dispersion (Abbildung 4.8F) bei etwa 6,7 : 1, in der Dispersion aus Lipoid S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE ebenfalls bei etwa 6,7 : 1 und bei den separierten Partikeln (Abbildung 4.8D) bei ungefähr 8,3 : 1. Das Verhältnis von Lipoid S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE ist zu klein. Eine theoretische Ursache könnte sein, dass die PEG-Kette kürzer ist als angenommen. Um eine Abweichung aufgrund eines möglicherweise geringeren Molekulargewichts des MPEG₂₀₀₀-DSPE auszuschließen, wurde das Signalverhältnis der Ethylenoxid-Einheiten zur Methoxy-Gruppe (3,7 ppm : 3,4 ppm) im Spektrum der MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung (Abbildung 4.8E) überprüft. Die PEG-Kette des MPEG₂₀₀₀-DSPE besitzt laut Herstellerangaben ein Molekulargewicht von 2000 g/mol und besteht aus 44 Ethylenoxid-Einheiten (entspricht 176 äquivalente Protonen). Daraus ergibt sich ein theoretisches Verhältnis der Ethylenoxid-Einheiten zu der Methoxy-Gruppe (3 äquivalente Protonen) von 58,7 : 1. Im NMR-Spektrum der MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösung (Abbildung 4.8E) erhält man ein etwas kleineres Signalverhältnis von 50 : 1, welches einer um etwa 7 Ethylenoxid-Einheiten kürzeren Kette entsprechen würde. Dies hätte aber mit 14,6 : 1 statt 16,7 : 1 nur einen geringen Einfluss auf das theoretische Verhältnis an Phosphatidylcholin-Molekülen zu MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekülen. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung vom theoretischen Verhältnis an Phosphatidylcholin-Molekülen zu MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekülen könnte sein, dass bei der NMR-Messung nicht alle Phosphatidylcholin-Moleküle erfasst werden, da ihre Mobilität durch Einlagerung in die Grenzfläche oder Einbau in die Lipidmatrix verringert ist [133]. Dem widerspricht aber das ebenfalls zu kleine Verhältnis von Lipoid S100 zu MPEG₂₀₀₀-DSPE in der Dispersion aus Lipoid S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE. Eine quantitative Aussage über die PEGylierung ist daher unter den verwendeten Standardmessbedingungen nicht möglich. Das Ziel, die PEGylierung nachzuweisen, wurde erreicht. Um aber eine zuverlässige quantitative Auswertung zu machen, müssen die Messbedingungen überprüft und ggf. optimiert werden, z.B. könnte eine Erhöhung der Abklingzeit zwischen den Impulsen notwendig sein, um eine vollständige Relaxation des Systems zu gewährleisten.

4.2 Stabilität unterkühlt-smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel unter besonderer Berücksichtigung der chemischen Stabilität

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die chemische und physikalische Stabilität von Phospholipid-stabilisierten unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln zu untersuchen. Sowohl Cholesterolerster als auch Phospholipide sind z.B. anfällig für Oxidation und Hydrolyse. Erste Untersuchungen der chemischen Stabilität wurden von Kuntsche et al. an Systemen, die gereinigtes Sojabohnen-Lecithin als Stabilisator in Kombination mit Natriumglycocholat enthielten, durchgeführt [57]. Diese Systeme zeigten nur eine leichte Phospholipid-Hydrolyse nach dem Homogenisationsprozess oder nach darauffolgender Autoklavierung. Erst eine Lagerung unter thermischen Stressbedingungen (48 h bei 90 °C) führte in den Systemen zu einer deutlichen Phospholipid-Hydrolyse, wohingegen bei reinen Phospholipid-Dispersionen unter den gleichen Bedingungen mittels HPTLC massive Hydrolyse beobachtet wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass Phospholipid-Moleküle in der Oberfläche der Nanopartikel weniger empfindlich gegenüber Hydrolyse sind als jene in Liposomen [57], die sich ebenfalls in der wässrigen Phase befinden und mittels Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet werden können [1, 7]. In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf eine mögliche Phospholipid-Hydrolyse in den in Abschnitt 4.1.5 vorgestellten Untersuchungen erhalten. Nach dem Autoklavieren von Dispersionen, die mit S100 und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisiert waren, wurde ein Anstieg des negativen Zetapotentialbetrages detektiert.

Eine weitere mögliche Instabilität, die für diese Art von Partikeln berücksichtigt werden muss, ist die hydrolytische oder oxidative Zersetzung des Cholesterylmyristats. Die Oxidation der Doppelbindung im Cholesterolmolekül führt zu der Entstehung von Oxysterolen, von denen manche als zytotoxisch und atherogen gelten [135].

Daher wurde der Effekt der Schmelz-Homogenisation, der Temperatur und besonders der Langzeit-Lagerung auf die chemische und physikalische Stabilität der smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel beobachtet.

4.2.1 Veränderungen von pH, Zetapotential und Partikelgröße während der Lagerung

Das Zetapotential der Dispersionen wurde direkt nach der Herstellung (siehe Abschnitt 4.1.2) und nach einem, drei und sechs Monaten Lagerung bestimmt. Für die Dispersionen

stabilisiert mit einer Mischung aus S100 und NaGC wurde nur eine geringe Zunahme des negativen Zetapotentials nach 6 Monaten beobachtet, welche nur die Systeme mit 0 und 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE betraf (Abbildung 4.9A). Im Gegensatz dazu zeigten die Systeme ohne NaGC eine deutliche Zunahme des Zetapotentialbetrages während der Lagerung, welche auf eine massive Hydrolyse der Phospholipide S100 und S75 hindeutet (Abbildung 4.9B, C). Es ist auffällig, dass die negativsten Werte für Proben ohne MPEG₂₀₀₀-DSPE beobachtet wurden und dass der Betrag des Zetapotentials mit steigendem Gehalt an MPEG₂₀₀₀-DSPE abnahm. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die PEG-Ketten verursacht, die die Oberflächenladung der Partikel abschirmen (siehe Abschnitt 4.1.2) und nicht durch eine geringere Phospholipid-Hydrolyse in diesen Proben. Da die Hydrolyse der Phospholipide einen Abfall des pH-Wertes aufgrund der Bildung freier Fettsäuren verursacht, wurden die pH-Werte der Systeme nach einer Lagerung von 6 Monaten untersucht. Ein massiver Abfall auf einen sauren pH-Wert (ca. pH 3) konnte in allen Dispersionen, die nur mit Phospholipid stabilisiert waren, beobachtet werden, wohingegen der pH-Wert der NaGC-haltigen Dispersion bei pH 5,5 lag (Abbildung 4.9D). Diese Ergebnisse weisen auf eine ausgeprägte Phospholipid-Hydrolyse in den mit S75 und S100 stabilisierten Systemen während der Lagerung hin. Die Verwendung von NaGC scheint hingegen die Phospholipid-Hydrolyse zu verringern.

Hinsichtlich ihrer Partikelgröße blieben alle Dispersionen über einen Lagerungszeitraum von 6 Monaten stabil bis auf die allein mit S100 stabilisierte Probe, die Phasentrennung zeigte (siehe Abbildung 4.10). Nach 6 Monaten Lagerung konnte nur eine leichte Zunahme des *Z-Average*-Durchmessers und des Polydispersitätsindex für die mit der Kombination S100/NaGC stabilisierten Proben, sowie für die nicht-PEGylierten Proben stabilisiert mit S75 beobachtet werden. Diese könnte durch eine teilweise Rekristallisation der smektischen Partikel verursacht worden sein (siehe Anhang, Abbildung A.1). Kristalline Partikel besitzen eine anisometrische, Plättchen-artige Form, die zu einem größeren *Z-Average*-Wert führt [1]. Die PEGylierten Proben stabilisiert mit S100 oder S75 zeigten dagegen eine leichte Zunahme des *Z-Average* nach einem Monat Lagerung, gefolgt von einer Abnahme nach 3 bis 6 Monaten (Abbildung 4.10). Die Veränderungen des *Z-Average*-Durchmessers und des Polydispersitätsindex dieser Proben spiegeln wahrscheinlich Veränderungen in der kolloidalen Zusammensetzung der Dispersionen, verursacht durch die Phospholipid-Hydrolyse, wider. Die Hydrolyse von Phospholipiden führt zur Entstehung von freien Fettsäuren und Lyso-Phosphatidylcholin. Es ist bekannt, dass diese Hydrolyseprodukte die Integrität von Liposomen beeinflussen [113]. Der anfängliche Anstieg des *Z-Average* könnte durch eine Fusion der in der Wasserphase anwesenden Phospholipid-Vesikel verursacht werden, gefolgt von einer Vesikel-Mizell-Transformation im fortgeschrittenem Stadium der Hydrolyse [136], die wiederum zu einer Abnahme des *Z-Average* führt. Eine geringfügige Rekristalli-

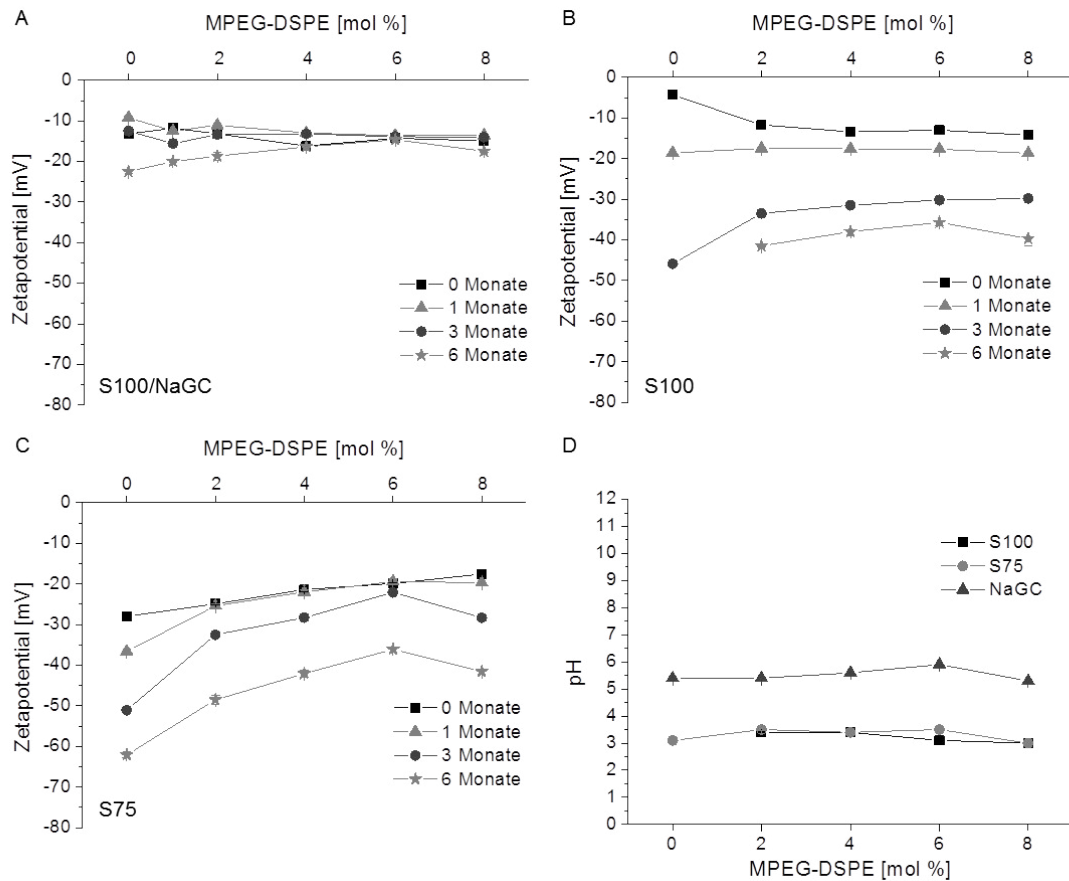


Abbildung 4.9: Zetapotential nach 0, 1, 3 und 6 Monaten (A-C) und pH-Werte nach 6 Monaten (D) der Dispersionen stabilisiert mit S100/NaGC (A), S100 (B) oder S75 (C) und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE. Die Symbole wurden zur besseren Veranschaulichung verbunden. Die nur mit S100 stabilisierte Probe zeigte Phasentrennung nach der Lagerung von 6 Monaten und ist daher nicht dargestellt.

sation der Partikel könnte ebenfalls zu dem anfänglichen Anstieg des *Z-Average* beitragen. Allerdings ist die rekristallisierte Fraktion in diesen Proben nach einer Lagerung von 6 Monaten geringer als in den nicht-PEGylierten Proben oder in den NaGC-haltigen Proben (siehe Anhang, Abbildung A.1) und jeder resultierende Anstieg des *Z-Average*-Wertes wird wahrscheinlich durch die Effekte der massiven Phospholipid-Hydrolyse überlagert. Da die Veränderungsprozesse der kolloidalen Strukturen in der wässrigen Phase vermutlich sehr komplex sind, werden zu ihrer detaillierten Aufklärung weitere Untersuchungen benötigt.

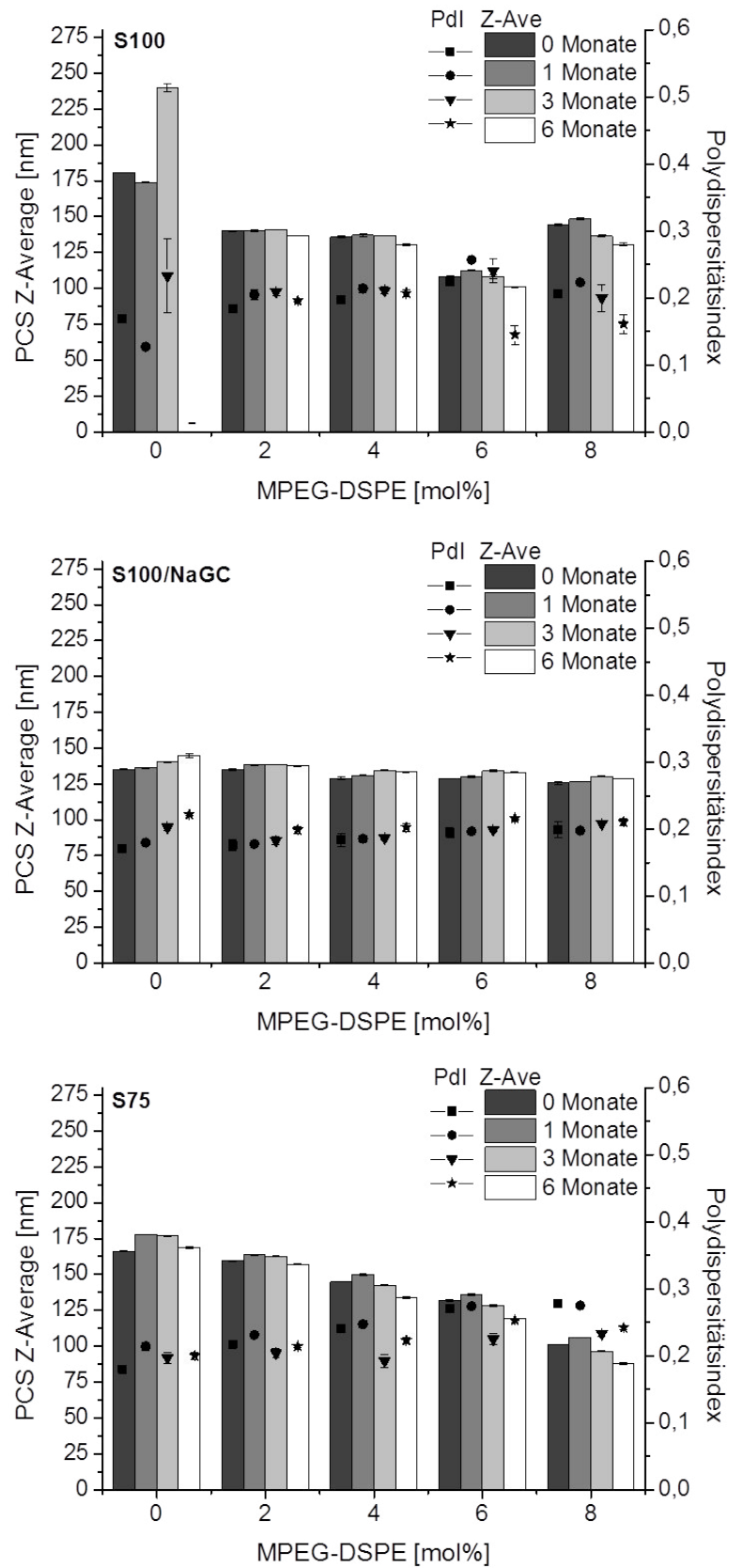


Abbildung 4.10: Z-Average-Durchmesser und Polydispersitätsindex (PCS) der Dispersionen nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten Lagerung. Die nur mit S100 stabilisierte Probe zeigte Phasentrennung nach der Lagerung von 6 Monaten und ist daher nicht dargestellt.

4.2.2 HPTLC-Analyse von Dispersionen nach Lagerung

Um die chemische Stabilität der Phospholipide während der Lagerung direkt zu analysieren, wurden Untersuchungen mittels HPTLC von den Dispersionen nach einer Lagerung von 5-8 Monaten durchgeführt (Abbildung 4.11). In den Dispersionen stabilisiert mit S75 und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE waren Phosphatidylcholin und sogar Lyso-Phosphatidylcholin nach 8 Monaten Lagerung fast vollständig zersetzt. Eine starke Zersetzung von Phosphatidylcholin wurde auch in den Dispersionen mit S100 und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE nach Lagerung über 5 Monate beobachtet. In den Proben mit 2 und 4 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE wurden nur schwache Banden an Phosphatidylcholin und Lyso-Phosphatidylcholin detektiert. Die mit S100/NaGC und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Systeme zeigten deutliche Banden an Phosphatidylcholin und nur sehr schwache Banden an freien Fettsäuren oder Lyso-Phosphatidylcholin nach 7 Monaten Lagerung. Dies bestätigt die Annahme, dass Natriumglycocholat die Hydrolyse der Phospholipide reduziert. Natriumglycocholat scheint nicht nur die physikalische Stabilität aufgrund seiner Funktion als Co-Stabilisator zu erhöhen, sondern auch die chemische Stabilität. Zwischen der Bande der freien Fettsäuren und des Cholesterylmyristats wurde in mehreren Systemen ohne Natriumglycocholat eine Bande unbekannter Herkunft beobachtet (markiert mit einem Fragezeichen in Abbildung 4.11). Die Analyse dieser Bande wird in Abschnitt 4.2.5 beschrieben.

4.2.3 HPTLC-Analyse von Dispersionen nach Herstellung und Kurzzeit-Lagerung

Um die Zersetzung der Phospholipide während des Herstellungsprozesses und einer Kurzzeit-Lagerung von 5 Wochen zu analysieren, wurde ein weiteres Set an ausgewählten Dispersionen frisch hergestellt und mittels pH-, Zetapotential- und HPTLC-Messungen untersucht. Da der Herstellungsprozess mit hohen Temperaturen (95 °C vor und 86-88 °C während der Homogenisation) verbunden ist, könnte es auch schon vor der Lagerung zur Zersetzung kommen. Die Phospholipid-Hydrolyse ist bekannterweise pH-abhängig, mit der langsamsten Zersetzungsrate bei ungefähr pH 6,5 [111], daher wurde in ausgewählten Dispersionen TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) zur wässrigen Phase gegeben. Dieser Puffer wurde in Hinblick auf einen physiologischen pH und eine parenterale Applikation ausgewählt. Dispersionen, die nur mit Phospholipid stabilisiert waren, zeigten eine Zunahme des negativen Zetapotentialbetrages und einen ausgeprägten Abfall des pH-Wertes schon 5 Wochen nach der Herstellung, wohingegen das Zetapotential und der pH in den Systemen mit TRIS-Puffer oder NaGC relativ stabil waren (Abbildung 4.12). Bei der TRIS-haltigen,

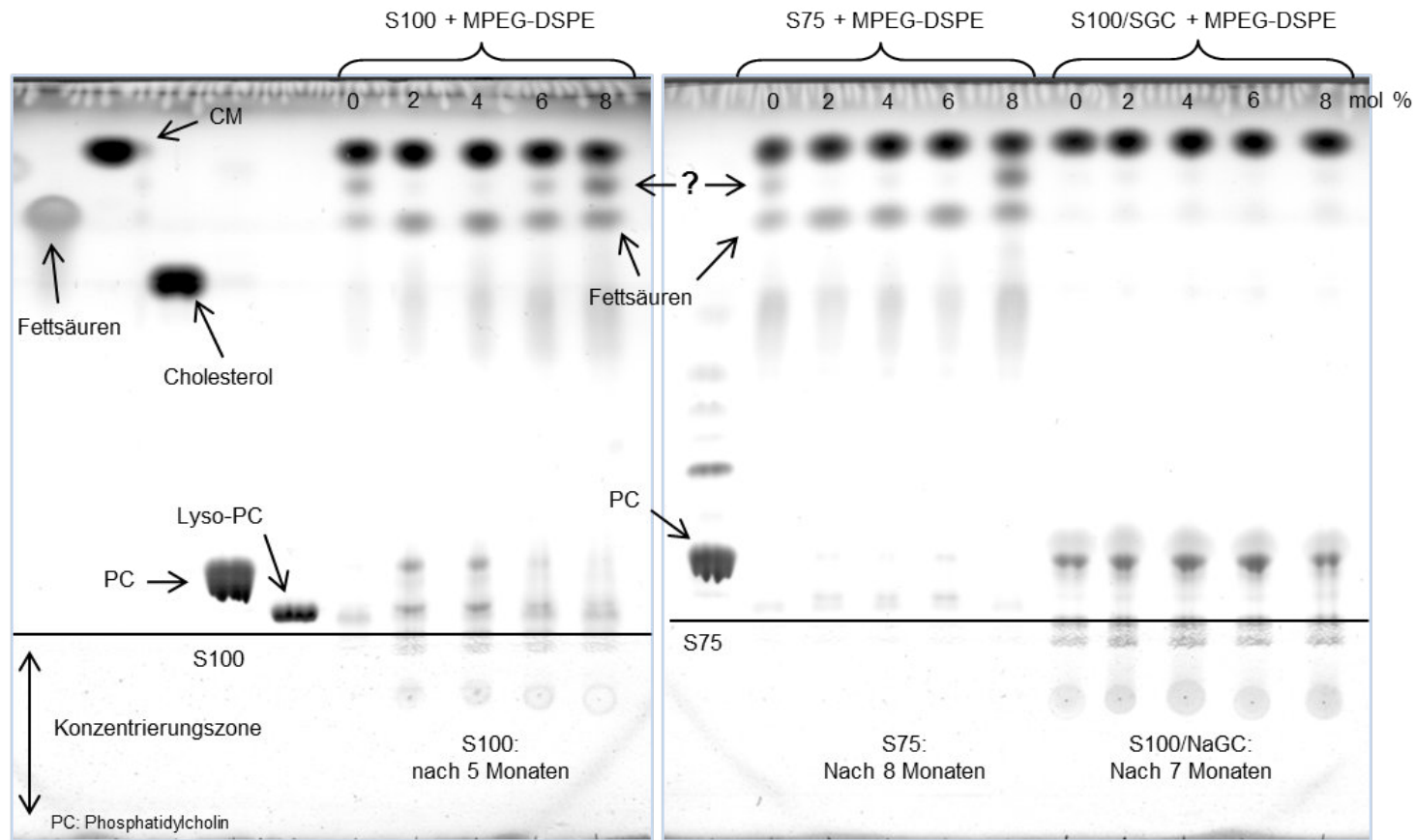


Abbildung 4.11: HPTLC-Ergebnisse der mit S100 (nach 5 Monaten), S75 (nach 8 Monaten) oder S100/NaGC (nach 7 Monaten) und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Dispersionen und ausgewählten Referenzsubstanzen. Das Fragezeichen markiert die Position der Bande unbekannter Herkunft.

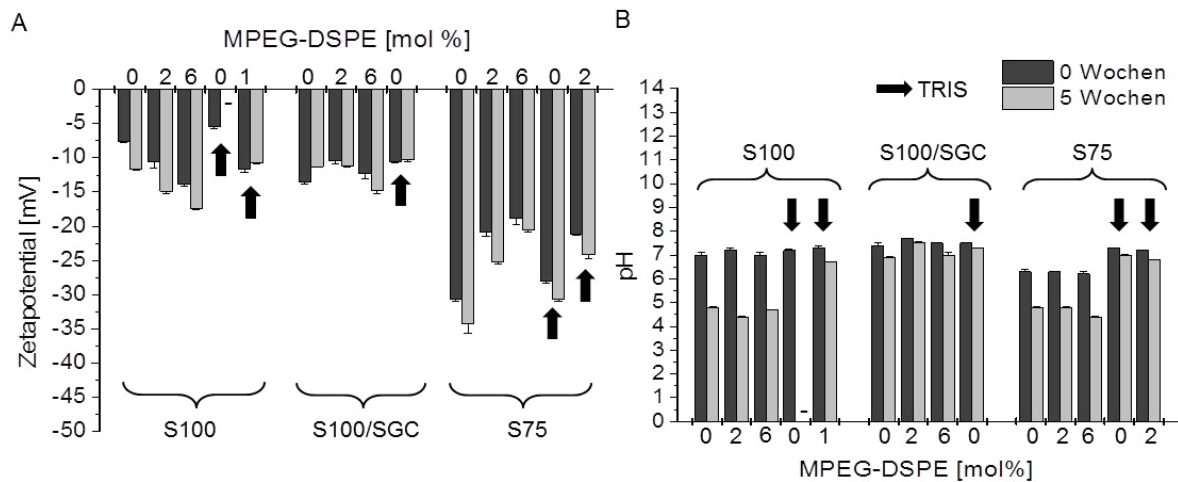


Abbildung 4.12: Zetapotential (A) und pH (B) von ausgewählten Dispersionen direkt nach der Herstellung und nach 5 Wochen Lagerung. Systeme markiert mit einem Pfeil enthalten TRIS-Puffer (10 mM, pH 7.4). Die nur mit S100 stabilisierte und TRIS-Puffer enthaltende Probe zeigte Phasentrennung nach der Lagerung von 5 Wochen und ist daher nicht dargestellt.

nur mit S100 stabilisierten Probe trat nach 5 Wochen Lagerung Phasentrennung auf. In dieser Probe reduziert der TRIS-Puffer das Zetapotential und die elektrostatische Stabilisierung und führt so zur Instabilität. Eine zusätzliche sterische Stabilisierung z.B. durch MPEG₂₀₀₀-DSPE oder eine ausreichende elektrostatische Abstoßung durch ein höheres Zetapotential z.B. durch Stabilisierung mit S75 ist daher Voraussetzung für das Puffern der Proben.

Die Hochdruck-Schmelzhomogenisation trägt nicht zu einer deutlichen Verringerung der chemischen Stabilität bei, da direkt nach der Herstellung mittels HPTLC keine Phospholipid-Hydrolyse detektiert werden konnte (Abbildung 4.13A). Nach 5 Wochen Lagerung wurde eine Hydrolyse in den nur mit Phospholipid stabilisierten Dispersionen durch die Detektion von Lyso-Phosphatidylcholin-Banden bestätigt (Abbildung 4.13B). Im Gegensatz dazu scheint die Anwesenheit von Natriumglycocholat und TRIS-Puffer die Phospholipid-Hydrolyse zu unterdrücken. Natriumglycocholat könnte ähnlich wie Natriumoleat als Puffer wirken [115]. Der Puffereffekt von Oleat in kolloidalen pharmazeutischen Systemen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es ist bekannt, dass der pK_a von Fettsäuren sich verändert, wenn sie in mizellaren oder lamellaren Strukturen oder Phospholipid-Bilayern angeordnet sind [115, 137, 138]. Der pK_a von Oleat-Anionen verschiebt sich von ungefähr 5 in der Bulkphase zu etwa 7 durch eine Inkorporation in Phospholipid-Bilayer-Membranen („scheinbarer pK_a “) aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante der Umgebung und dem Einfluss benachbarter Ladungen [138]. Für Cholsäure wird ein pK_a von ungefähr 5 und ein scheinbarer pK_a zwischen 6,8 und 7,3 angegeben [139]. Der pK_a von Glycocholsäure ($pK_a = 4$ [140]) müsste sich daher erwartungsgemäß in

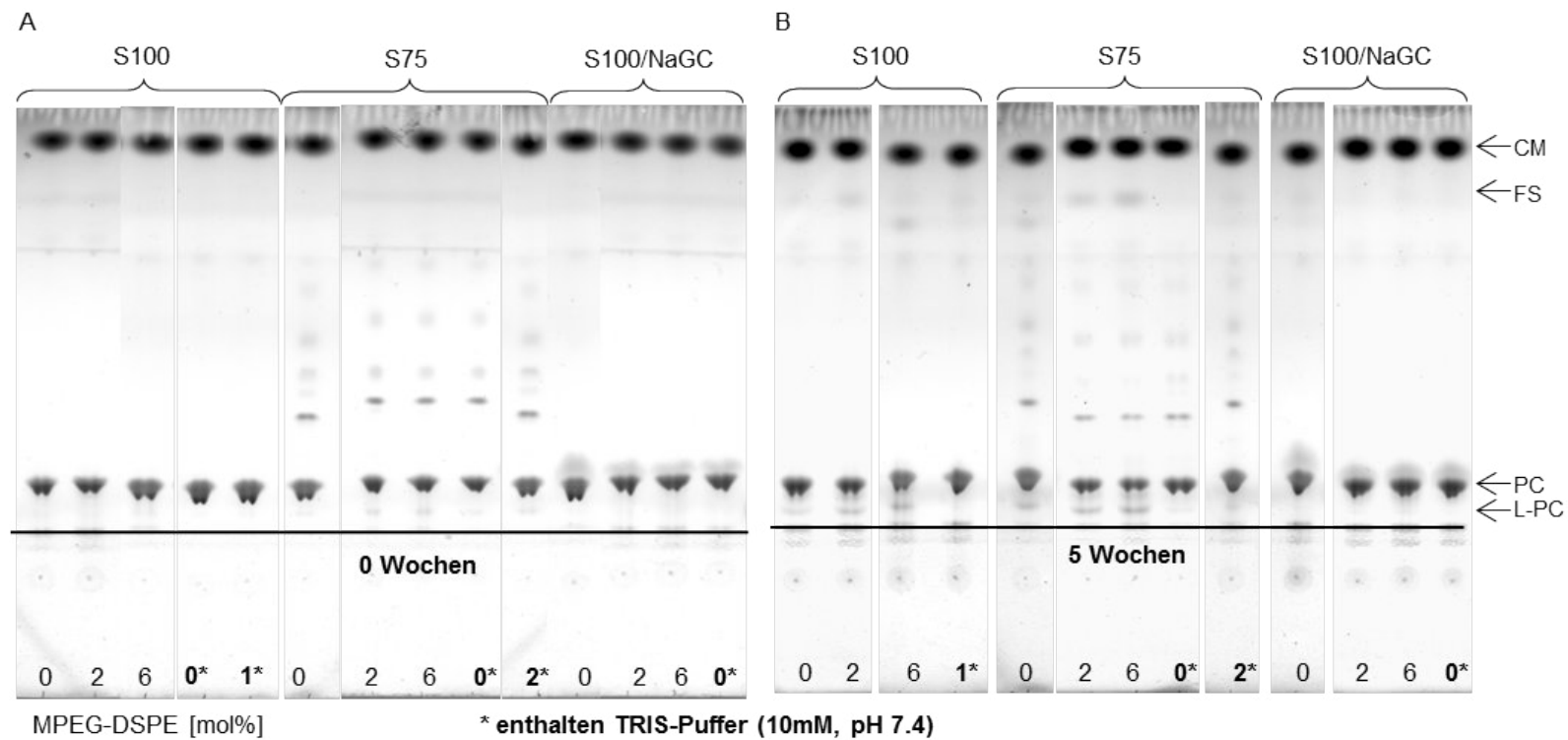


Abbildung 4.13: HPTLC-Ergebnisse von ausgewählten Dispersionen direkt nach der Herstellung (A) und nach 5 Wochen Lagerung (B). Systeme markiert mit einem Stern enthalten TRIS-Puffer (10 mM, pH 7.4).

einer ähnlichen Weise bei der Inkorporierung in kolloidale Strukturen verschieben. Dies würde einen Puffereffekt bei ungefähr pH 6 bewirken, nahe dem pH-Optimum der Phospholipide [111].

4.2.4 Veränderungen des Phasenverhaltens während der Lagerung

Die DSC-Kurven des allgemeinen Phasenverhaltens einer mit S100 und NaGC stabilisierten Dispersion sind in Abbildung 2.2 dargestellt und in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben. Um den Effekt der Langzeit-Lagerung auf das Phasenverhalten von Cholesterylmyristat-Nanopartikeln zu untersuchen, wurden DSC-Messungen an ausgewählten Dispersionen direkt nach der Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung durchgeführt. Die DSC-Kühlkurven nach dem ersten Heizschritt sind in Abbildung 4.14 dargestellt. In den nur mit S100 und S75 stabilisierten Dispersionen verschoben sich nach 6 Monaten Lage-

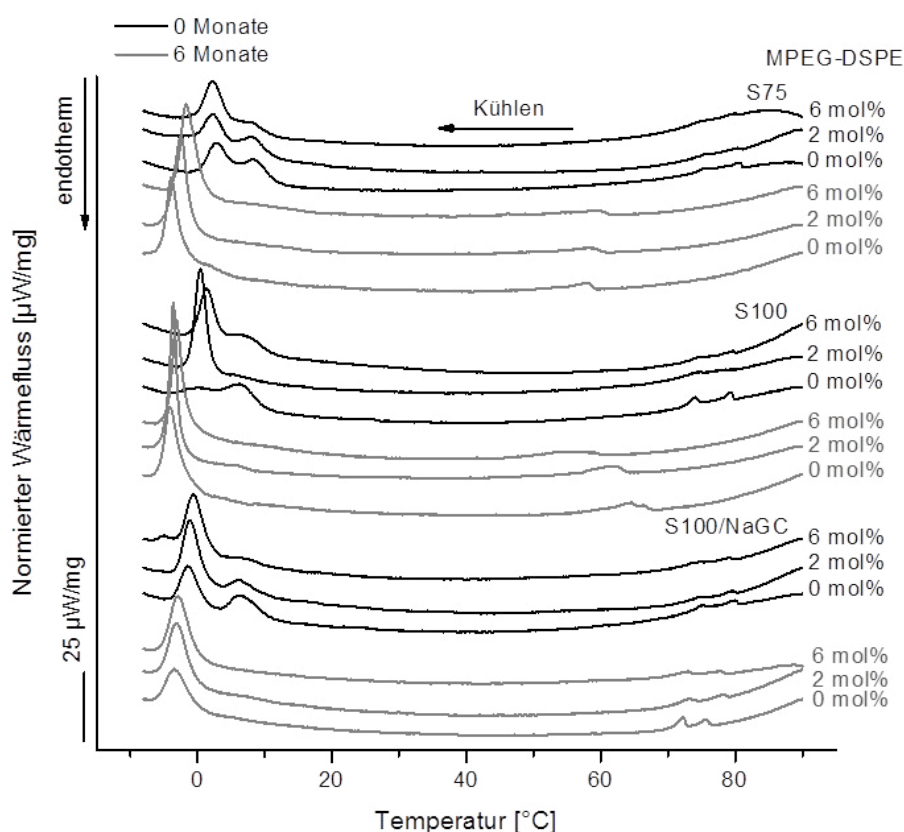


Abbildung 4.14: DSC-Kühlkurven von ausgewählten CM-Dispersionen nach der Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung. (Partikelgrößen und PDI-Werte der Dispersionen siehe Tabelle A.1 im Anhang A2.)

rung die flüssigkristallinen Phasenübergänge deutlich zu niedrigeren Temperaturen. Im Gegensatz dazu wurde in den Dispersionen, die NaGC in Kombination mit S100 enthielten, nur eine geringfügige Verschiebung detektiert. Berücksichtigt man, dass die mit S75 und S100 stabilisierten Systeme ein viel größeres Ausmaß an Phospholipid-Hydrolyse aufweisen als S100/NaGC-Systeme, wird die Verschiebung vermutlich durch die Bildung freier Fettsäuren hervorgerufen. Da eine Verschiebung der flüssigkristallinen Übergänge zu niedrigeren Temperaturen auch bei Arzneistoff-beladenen Dispersionen (z.B. mit Etoimidat, Ibuprofen) [1] beobachtet wurde, könnte man zu dem Schluss kommen, dass die Verschiebung generell durch die Inkorporierung von Fremdsubstanzen in die Lipidmatrix der Partikel verursacht wird. Eine massive Phospholipid-Hydrolyse scheint außerdem die flüssigkristallinen Übergänge zusammenzuschieben.

Der Effekt von MPEG₂₀₀₀-DSPE auf die flüssigkristallinen Phasenübergänge wird in Abschnitt 4.1.3 beschrieben und konnte direkt nach der Herstellung beobachtet werden. Mit zunehmender Konzentration an MPEG₂₀₀₀-DSPE wurden die flüssigkristallinen Phasenübergänge zunehmend undeutlicher und waren zusammengeschoben.

Hinsichtlich des Kristallisationsereignisses konnten während der Langzeit-Lagerung weitere Veränderungen detektiert werden. Der Kristallisationspeak bei höheren Temperaturen verschwand und das Hauptkristallisationsereignis wurde zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Nach der Herstellung hängt die Fläche des Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen stark von der Partikelgröße ab [56]. Es wurde vermutet, dass die bimodale Kristallisation durch zwei Partikelfractionen mit unterschiedlicher Gestalt und Größe, die mittels Elektronenmikroskopie beobachtet wurden, hervorgerufen wird [56]. Bei der Fläche des Peaks bei höheren Temperaturen wird angenommen, dass sie die Kristallisation größerer Partikel mit einer kugelartigen Form darstellt. Kleine smektische Partikel bevorzugen eine zylindrische Form (die in Hinblick auf die Schichtstruktur der smektischen Phase energetisch günstiger sein sollte) und sie kristallisieren bei niedrigeren Temperaturen. Möglicherweise lagern sich die kugelförmigen Partikel während der Lagerung in die bevorzugten zylindrischen Partikel um und führen so zu einer Abnahme oder zum Verschwinden des Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen [56]. Als Grund für die Verschiebung des Hauptkristallisationspeaks wurde eine Veränderung der Zusammensetzung der Lipidmatrix vorgeschlagen [56]. Im vorliegenden Fall scheint es möglich, dass sich aufgrund der massiven Phospholipid-Hydrolyse freie Fettsäuren und Lyso-Phospholipide in der Nanopartikelgrenzfläche und im Falle der freien Fettsäuren auch im Kern anreichern. Um zu untersuchen, inwieweit die Bildung von freien Fettsäuren für die Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge und des Hauptkristallisationspeaks verantwortlich sein könnte, wurden zwei Herangehensweisen ausgewählt: Die Bildung freier Fettsäuren wurde durch die Lagerung ausgewählter Dispersionen bei erhöhten Temperaturen (40 °C)

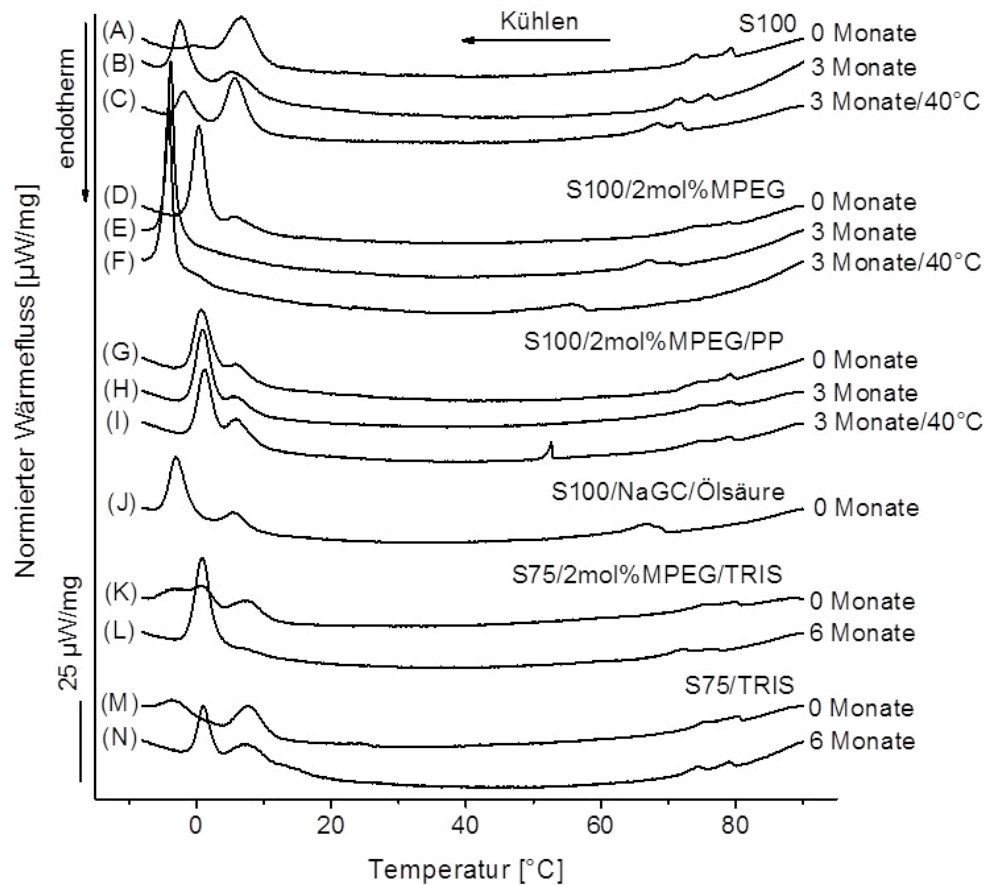


Abbildung 4.15: DSC-Kühlkurven von ausgewählten CM-Dispersionen, A-I: direkt nach der Herstellung und nach 3 Monaten Lagerung bei 20 °C und bei 40 °C (PP: Phosphatpuffer), J: CM-Dispersion stabilisiert mit 1,6% S100/0,4% NaGC und 0,4% Ölsäure direkt nach der Herstellung, K-N: CM-Dispersionen mit TRIS-Puffer direkt nach der Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung. (Partikelgrößen und PdI-Werte der Dispersionen siehe Tabelle A.2 im Anhang A2).

über 3 Monate beschleunigt und zusätzlich wurde eine Dispersion mit Ölsäure-haltigen Nanopartikeln hergestellt (Abschnitt 3.2.1.5). Die Phospholipid-Hydrolyse folgt einer Kinetik pseudo-erster Ordnung und nimmt bei höheren Temperaturen entsprechend der Arrhenius-Gleichung zu [141]. Daher sollte der beobachtete Effekt in den bei 40 °C gelagerten Dispersion verstärkt im Vergleich zu den bei 20 °C gelagerten auftreten. Die DSC-Kühlkurven B, C, E, F in Abbildung 4.15 zeigen, dass die flüssigkristallinen Phasenübergänge der bei 40 °C gelagerten Proben tatsächlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben waren als in den entsprechenden bei 20 °C gelagerten Proben. Sie weisen somit auf eine durch die Entstehung von Phospholipid-Zersetzungsprodukten verursachte Verschiebung hin. Die Verschiebung wurde unterdrückt, wenn die wässrige Phase mit TRIS- oder Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) versetzt wurde, um die Phospholipid-Hydrolyse zu verlangsamen (Abbildung 4.15 G-I, K-N). Weder die Lagerung bei 40 °C (I) noch die

Langzeit-Lagerung (L und N) führten zu einer deutlichen Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge in den gepufferten Proben. Eine mit S100 und NaGC stabilisierte Dispersion, die zusätzlich 0,4% Ölsäure enthielt, wurde durch Zugabe der Fettsäure zum Cholesterylmyristat vor dem Schmelz- und Homogenisationsprozess hergestellt. Die Inkorporierung der Ölsäure schob tatsächlich die flüssigkristallinen Übergänge zusammen und in Richtung niedrigerer Temperaturen (Abbildung 4.15, J). Außerdem nahm die Kristallisationstemperatur des Hauptpeaks ab. Dies bestätigt, dass die freien Fettsäuren die Verschiebung der flüssigkristallinen Übergänge und des Hauptkristallisationspeaks hervorrufen.

4.2.5 HPTLC- und HPLC-Analyse weiterer Zersetzungsprozesse in den Dispersionen

In den Dispersionen wurde nach einer Lagerung von 5-8 Monaten eine Bande unbekannter Herkunft durch HPTLC-Analyse beobachtet (Abschnitt 4.2.2, Abbildung 4.11). Es scheint, als würde die Größe der Cholesterylmyristat-Bande mit dem Auftreten der unbekannten Bande abnehmen, daher wurde die Bildung eines Zersetzungsproduktes des Cholesterylmyristats angenommen. Da keine Cholesterol-Bande detektiert werden konnte, wurde eine Hydrolyse des Cholesterylmyristats als mögliche Ursache ausgeschlossen. Hinsichtlich des R_f -Wertes ist das unbekannte Produkt etwas polarer als Cholesterylmyristat. Dieses könnte auf die Entstehung eines Oxidationsproduktes des Cholesterylmyristats hinweisen. Die Abnahme des Cholesterylmyristat-Gehaltes in den Dispersionen mit zunehmender Konzentration des Zersetzungsproduktes wurde auch durch HPLC beobachtet (Abbildung 4.16). Die Cholesterylmyristat-Konzentration war in den Proben mit dem Zersetzungsprodukt auf 1,6-1,9% reduziert im Vergleich zu 2,2-2,3% in den Dispersionen ohne Zersetzungsprodukt. Aufgrund des Totvolumens im Leitungssystem des Homogenisators kann eine leichte Verdünnung der Proben nicht vermieden werden, auch wenn der erste Homogenisierhub verworfen wird. Daher ist die Konzentration an Cholesterylmyristat in den Proben immer etwas niedriger als der Sollgehalt von 2,5%.

Die Zersetzung des Cholesterylmyristats wurde auch nach der Herstellung und Kurzzeit-Lagerung untersucht. Das Zersetzungsprodukt konnte weder direkt nach der Herstellung, noch nach einer Lagerung von 5 Wochen mittels HPLC (Daten nicht aufgeführt) und HPTLC (Abbildung 4.13) nachgewiesen werden.

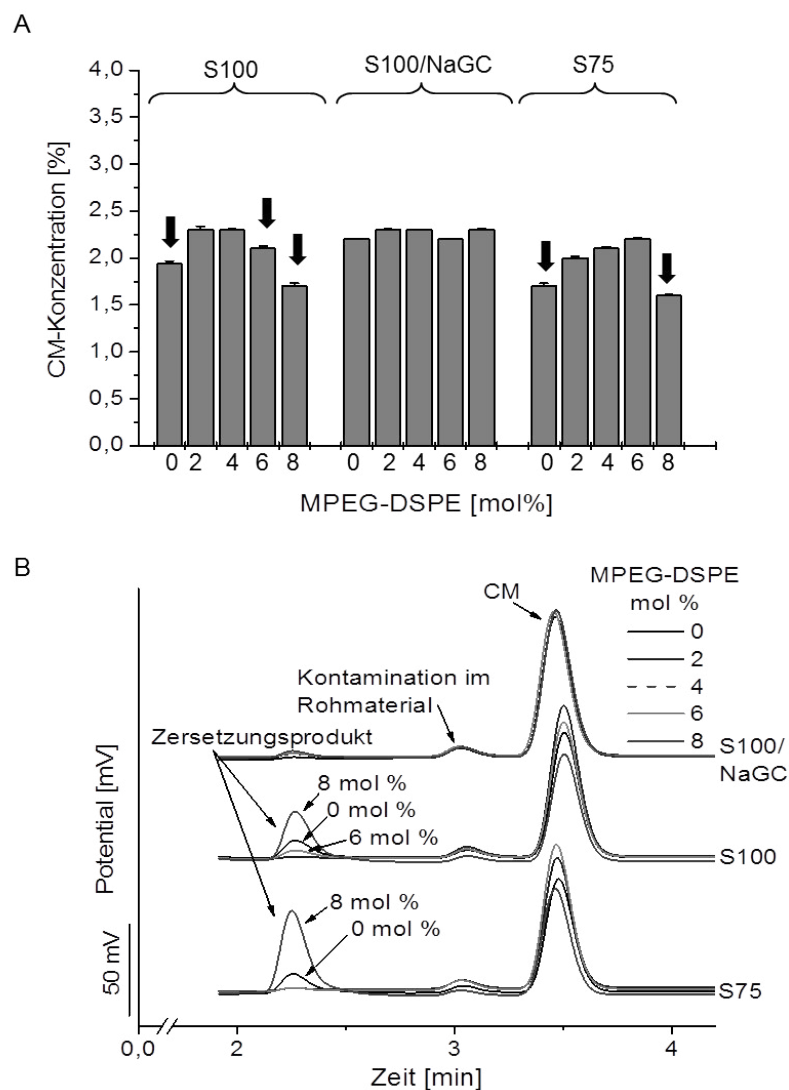


Abbildung 4.16: CM-Konzentration in den Dispersionen stabilisiert mit S100 (nach 5 Monaten), S100/NaGC (nach 7 Monaten) oder S75 (nach 8 Monaten) und 0-8 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (A) und die HPLC-Chromatogramme der entsprechenden Dispersionen (B). Die Pfeile in Abbildung A markieren die Detektion des Zersetzungsproduktes in den Proben. Das Signal mit der Bezeichnung „Kontamination im Rohmaterial“ wurde auch in der Referenzlösung des Rohmaterials erhalten.

4.2.6 Untersuchung des Zersetzungsproduktes von Cholesterylmyristat

4.2.6.1 Lagerung unter Stressbedingungen

Da Oxidation als Ursache für die Zersetzung vermutet wurde, sollte die Entstehung des Zersetzungsproduktes von Cholesterylmyristat durch den Kontakt mit Luftsauerstoff nachgewiesen werden. Es wurden zwei jeweils mit S100 und 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierte Dispersionen ausgesucht. Eine der beiden Dispersionen enthielt zusätzlich noch

Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) in der wässrigen Phase. Um einen ausreichenden Kontakt der Dispersion mit Luftsauerstoff zu ermöglichen, wurde 1 ml der jeweiligen Dispersion in ein 2 ml-Injektionsvial abgefüllt und die Vials wurden während der Lagerung jeden dritten Tag geöffnet. Referenz-Vials wurden vollständig mit den entsprechenden Dispersionen gefüllt und blieben bis zur HPTLC-Analyse verschlossen. Alle Proben wurden bei 40 °C für 6 Wochen gelagert, bevor die HPTLC-Untersuchung durchgeführt wurde (Abbildung 4.17A).

Die Probe mit Phosphatpuffer zeigte nach der Lagerung mit Sauerstoffkontakt Phasentrennung. Alle anderen Proben blieben stabil. Auf den HPTLC-Platten wurde eine deutliche Bande des Zersetzungsproduktes in der unter Sauerstoff-Stressbedingungen gelagerten Probe detektiert, wohingegen die unter Sauerstoffausschluss gelagerten Proben kein Zersetzungsprodukt des Cholesterylmyristats aufwiesen. Die Dispersion ohne Phosphatpuffer zeigte wieder vollständige Phospholipid-Hydrolyse. Wie schon bei den DSC-Ergebnissen erkennbar (4.15, Kurven G-I) wurde die Phospholipid-Hydrolyse durch die Anwesenheit von Phosphatpuffer reduziert.

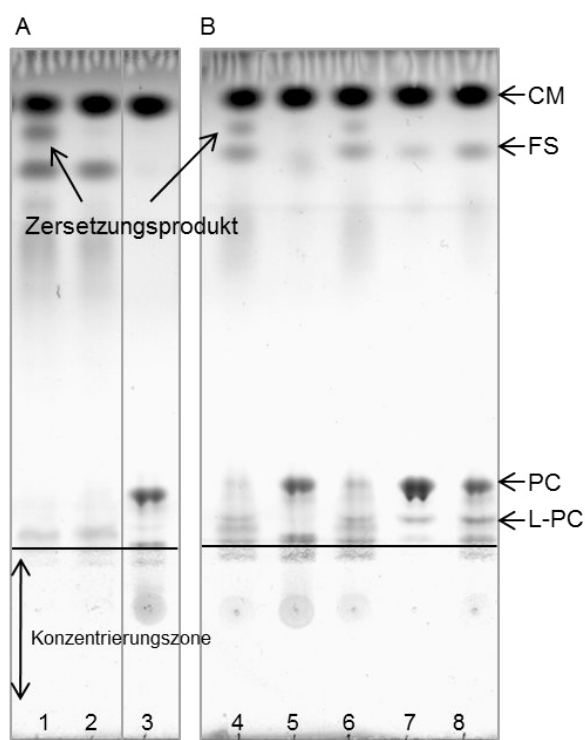


Abbildung 4.17: A: HPTLC-Ergebnisse der mit S100 und 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten CM-Dispersionen nach 6 Wochen Lagerung bei 40 °C, mit Sauerstoffkontakt (1), ohne Sauerstoffkontakt (2), ohne Sauerstoffkontakt und mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 (3); B: HPTLC-Ergebnisse der CM-Dispersionen nach 6 Monaten Lagerung bei 20 °C, stabilisiert mit S100 und 2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE (4) und zusätzlich Phosphatpuffer enthalten (5), nur mit S100 stabilisiert (6) und zusätzlich 100 µM EDTA (7) oder 0,01% α -Tocopherol enthalten (8).

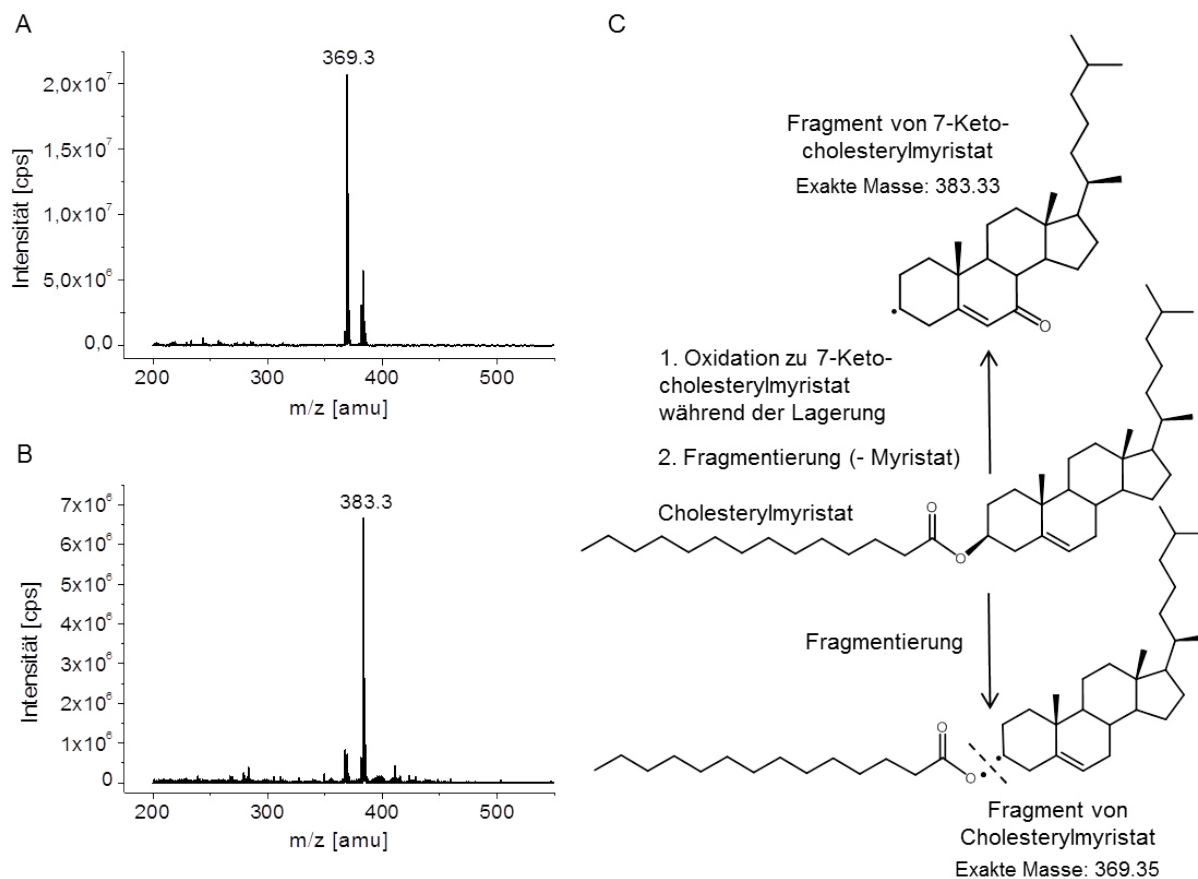


Abbildung 4.18: Massenspektrum der Cholesterylmyristat-Referenzlösung (A) und des separierten Zersetzungsproduktes (B). Fragmentierung während der Massenspektrometrie (APCI) von Cholesterylmyristat und 7-Ketocholesterylmyristat (C).

4.2.6.2 Massenspektrometrie

Um das Oxidationsprodukt zu identifizieren, wurde es mittels HPTLC (siehe Abschnitt 3.2.7) separiert und dann mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Referenz-Lösung von Cholesterylmyristat zeigte ein m/z-Signal bei 369,3 amu (Abbildung 4.18A) entsprechend dem Cholesterylmyristat-Fragment dargestellt in Abbildung 4.18C. Für die Lösung des separierten Zersetzungsproduktes wurde ein m/z-Signal bei 383,3 amu detektiert (Abbildung 4.18B). Basierend auf dem gleichen Fragmentierungsweg und in Übereinstimmung mit seinem Molekulargewicht konnte es als ein Fragment des 7-Ketocholesterylmyristats (Abbildung 4.18C) identifiziert werden. 7-Ketocholesterol ist eines der Haupt-Oxysterole gebildet durch die Oxidation von Cholesterol [135].

4.2.7 Schutz der Dispersionen vor Zersetzung

Die Studien zeigten, dass die Anwesenheit von Puffer (TRIS- oder Phosphatpuffer, 10 mM, pH 7,4) oder NaGC die Phospholipid-Hydrolyse in den Cholesterylmyristat-Dispersionen während der Lagerung reduziert. Um die Stabilität gegenüber Oxidation zu verbessern, wurde das lipidlösliche Antioxidans α -Tocopherol und der wasserlösliche Metallchelator EDTA verwendet. Zwei mit S100 stabilisierte Cholesterylmyristat-Dispersionen wurden hergestellt. Eine von beiden enthielt 0,01% α -Tocopherol und die andere 100 μ M EDTA (siehe Abschnitt 3.2.1.5). Beide Proben wurden mit Dispersionen verglichen, die mit S100, S100/2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE und S100/2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE/Phosphat-Puffer stabilisiert waren. Nach 6 Monaten Lagerung bei 20 °C wurden sie mittels HPTLC (Abbildung 4.17B) untersucht. Eine Bande des Oxidationsproduktes wurde nur in den mit S100 und S100/2 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Dispersionen beobachtet und deutet auf einen gewissen Schutz des Cholesterylmyristats durch EDTA, α -Tocopherol und Phosphatpuffer hin. Auch die Phospholipid-Hydrolyse wurde durch EDTA und geringfügig durch α -Tocopherol reduziert. Wahrscheinlich wird durch die Anwesenheit von EDTA oder α -Tocopherol auch eine mögliche Oxidation der Phospholipide verhindert. Durch die Oxidation von Phospholipiden können auch Fragmente mit Carboxylsäure-Gruppe entstehen [142], die wiederum zu einer Abnahme des pH-Wertes und somit zu einer Beschleunigung der Phospholipid-Hydrolyse beitragen würden.

4.3 Nachträgliche PEGylierung („*post-insertion*” Methode)

Die nachträgliche PEGylierung wird v.a. bei der Herstellung von sterisch stabilisierten („*stealth*”) Liposomen angewendet. Hierbei wird das PEGylierte Phospholipid aus einer mizellaren Phase in vorgefertigte klassische Liposomen überführt [130]. Auf gleiche Weise können auch Immunoliposomen hergestellt werden, wenn Liganden an die Mizellen aus MPEG-DSPE gekoppelt werden [143]. Um zu untersuchen, ob PEGylierte Cholesterylmyristat-Partikel auch mittels „*post-insertion*” Methode hergestellt werden können, wurden mit Lipoid S75 stabilisierte Cholesterylmyristat-Partikel nachträglich mit mizellaren MPEG₂₀₀₀-DSPE-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert. Die Inkubation wurde sowohl bei 23 °C als auch bei 60 °C durchgeführt, um einen Einfluss der Temperatur zu untersuchen. In der Regel verläuft die nachträgliche PEGylierung schneller und effizienter, wenn die Inkubation bei Temperaturen über der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide durchgeführt wird [130, 143]. Die Phasenübergangstemperatur des Lipoid S100 liegt bei ungefähr -20 °C [122] und die des DSPE in MPEG₂₀₀₀-DSPE-Mizellen bei 12 °C [144]. Eine erfolgreiche PEGylierung mittels „*post-insertion*” Methode sollte wie bei der konventionellen Herstellung an Veränderungen der Partikeleigenschaften wie Partikelgröße, Zetapotential oder Phasenverhalten zu erkennen sein. Die Untersuchung des Einflusses von MPEG₂₀₀₀-DSPE auf die Rekristallisation von konventionell hergestellten PEGylierten Cholesterylmyristat-Partikel während der Lagerung (siehe Abschnitt 4.1.4) zeigte, dass es schwierig ist, zwischen dem Einfluss der Partikelgröße und dem Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE zu unterscheiden. Da bei der „*post-insertion*” Methode immer dieselbe Ausgangsprobe verwendet wird, könnte sie eine Möglichkeit darstellen, den Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE getrennt von dem Einfluss der Partikelgröße auf die Rekristallisation zu untersuchen.

4.3.1 Partikelgröße und Polydispersitätsindex

Eine leichte Partikelgrößenzunahme mit steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration wurde mittels PCS direkt nach der Inkubation sowohl bei 23 °C als auch bei 60 °C detektiert (siehe Abbildung 4.19). Nur bei der Probe 2 mol%/23 °C kam es zu einer nicht erklärbaren Abnahme der Partikelgröße und des Polydispersitätsindex. Die Partikelgrößenzunahme der anderen Proben könnte daraufhin deuten, dass das MPEG₂₀₀₀-DSPE auf der Partikeloberfläche sitzt. Die hydrophilen, flexiblen PEG-Ketten ragen in die Lösung und vergrößern somit den hydrodynamischen Durchmesser. MPEG₂₀₀₀-DSPE-Mizellen

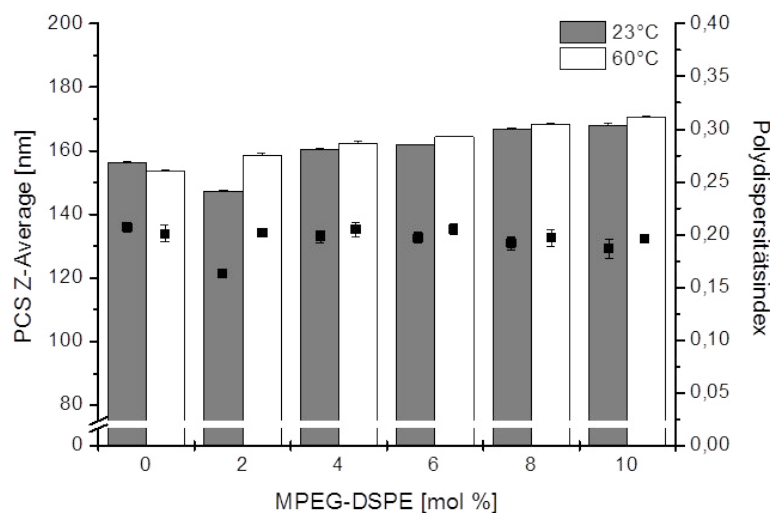


Abbildung 4.19: PCS *Z-Average*-Durchmesser und PdI-Werte der mit S75 stabilisierten Dispersion nach der Inkubation (bei 23 °C bzw. 60 °C) mit steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE.

besitzen einen Durchmesser von etwa 10 nm (PCS) [145], daher müsste durch die PEGylierung mit einer Zunahme des Partikelradius von etwa 5 nm bzw. des Partikeldurchmessers von etwa 10 nm in der „*brush*“-Konformation zu rechnen sein. Andere Quellen geben ebenfalls eine PEG-Schichtdicke von 5-6 nm an [77]. Bei einer geringen Polymerdichte auf der Partikeloberfläche liegen die Ketten geknäult („*mushroom*“-Konformation) vor und die Schichtdicke beträgt etwa 3,5 nm [146]. Die Ketten sind frei beweglich und interagieren nicht miteinander. Bei höheren Polymerdichten richten sich die Ketten gerade aus, um den Abstand zwischen den einzelnen Ketten möglichst groß zu halten („*brush*“-Konformation) [147]. Durch die Inkubation bei Raumtemperatur vergrößerte sich der Durchmesser der Partikel um bis ca. 12 nm (10 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE). Diese Zunahme des *Z-Average* könnte in etwa der Dicke einer PEG-Schicht entsprechen. Die Zunahme des *Z-Average* durch die Inkubation bei 60 °C war dagegen höher als erwartet. Der Durchmesser der Partikel vergrößerte sich um bis zu ca. 17 nm (10 mol% MPEG₂₀₀₀-DSPE). Eine Erklärungsmöglichkeit für die größere Zunahme des *Z-Average* könnte sein, dass die beobachteten Effekte nicht nur auf die PEGylierung der Nanopartikel, sondern auch auf andere Prozesse in der Wasserphase, zurückzuführen sind. Es ist zu beachten, dass ebenfalls eine PEGylierung der Liposomen in der Wasserphase stattgefunden oder dass Prozesse wie die Auflösung von Liposomen [148] bzw. Bildung von Mischmizellen durch steigende MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentrationen den *Z-Average* beeinflusst haben könnten [149]. Durch eine Inkorporierung von MPEG₂₀₀₀-DSPE müssten Phosphatidylcholin-Moleküle aus der Grenzfläche verdrängt werden. Diese könnten dann wiederum zur Bildung von Liposomen, Mischmizellen oder möglicherweise auch weiterer Phospholipid-Lamellen an

der Partikeloberfläche [133] beitragen. Beim Polydispersitätsindex waren mit Ausnahme der 2 mol%/23 °C Probe keine deutlichen Veränderungen zu beobachten. Im Gegensatz zur konventionellen Herstellung (siehe Abbildung 4.1) kam es zu keinem Anstieg des Polydispersitätsindex mit zunehmender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration aufgrund einer Zunahme der Fraktion von kleinen Partikeln im Bereich von 15-60 nm. Um die Vorgänge genauer zu klären, wäre eine Separierung der kolloidalen Strukturen und anschließende getrennte Inkubation mit MPEG₂₀₀₀-DSPE sinnvoll. Hierzu wurden erste Untersuchungen von Kuntsche et al. an Cholesterylnonanoat-Partikeln mittels asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung durchgeführt [145]. Die ersten Ergebnisse zeigen zwar eine erfolgreiche Trennung der Partikel von kleineren kolloidalen Strukturen, allerdings noch keine effektive PEGylierung der Partikel.

4.3.2 Zetapotential

Die bei 60 °C inkubierten Partikel zeigen direkt nach der Inkubation eine Abnahme des Zetapotentialbetrages (Abbildung 4.20). Dieses Phänomen tritt auch bei der konventionellen Herstellung durch die sterische Abschirmung der Oberflächenladung aufgrund der PEG-Ketten auf (siehe Abschnitt 4.1.2). Bei den bei Raumtemperatur inkubierten Partikeln war dagegen nur ein ganz leichter Trend hinsichtlich einer Abnahme des Zetapotentialbetrages sichtbar. Nach 19 Tagen Lagerung konnte aber auch in den Proben der 23 °C-Reihe ein abschirmender Effekt der PEG-Ketten detektiert werden. Dies könnte daraufhin deuten, dass die „*post-insertion*“ Methode bei Raumtemperatur langsamer bzw. unvollständig abläuft und während der Lagerung noch MPEG₂₀₀₀-DSPE-Moleküle in die Grenzfläche migrieren. Die Veränderungen des Zetapotentials während der Lagerung deuten allerdings auch auf eine Phospholipid-Hydrolyse hin. In Abschnitt 4.2 wurde die chemische Stabilität frühestens nach einem Monat Lagerung untersucht. Diese Ergebnisse zeigten bereits nach 19 Tagen schon Effekte der Phospholipid-Hydrolyse. Durch Phospholipid-Hydrolyse während der Lagerung entstehen freie Fettsäuren sowie Lyso-Phosphatidylcholin und es kommt zu einem Anstieg des negativen Zetapotentialbetrages (siehe Abschnitt 4.2.1). Dieses ist deutlich bei den nicht-PEGylierten Proben zu sehen, deren Zetapotentialbetrag sich von ungefähr -20 mV auf -37 mV (Inkubation bei 20 °C) bzw. -45 mV (Inkubation bei 60 °C) erhöht hat. Bei den PEGylierten Proben wird das negativere Zetapotential durch die PEG-Ketten abgeschirmt und mit steigender MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration nimmt der Betrag des Zetapotentials deutlich ab.

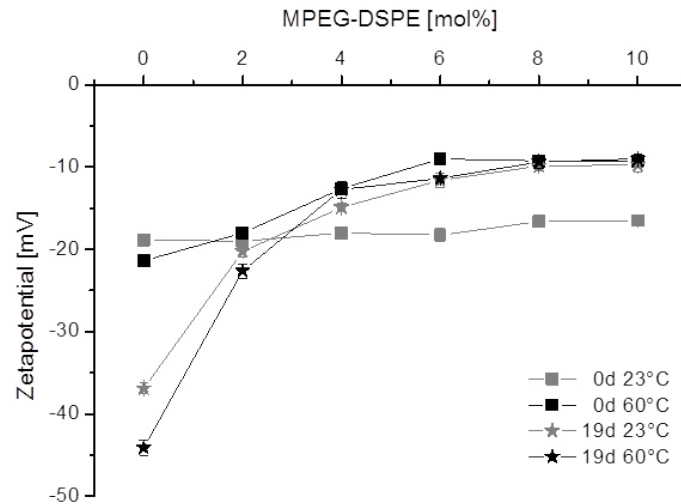


Abbildung 4.20: Zetapotential-Werte der mit S75 stabilisierten Dispersion direkt nach der Inkubation (bei 23 °C bzw. 60 °C) und nach 19 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur mit steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE.

4.3.3 Phasenverhalten

Eine Woche nach der Inkubation wurden DSC-Messungen durchgeführt und das Phasenverhalten der inkubierten Partikel auf den Einfluss von durch MPEG₂₀₀₀-DSPE hervorgerufenen Veränderungen untersucht. Da sich die nachträglich PEGylierten Partikel nur in ihrem hydrodynamischen Durchmesser aufgrund der in die wässrige Phase hineinragenden PEG-Ketten unterscheiden, aber nicht in der eigentlichen Größe des Cholesterylmyristat-Kerns, fällt der Einfluss der Partikelgröße auf das Phasenverhalten (siehe Abschnitt 4.1.3) weg. Daher sollte ein möglicher Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE gut zu erkennen sein. Eine Veränderung der Partikelgröße spiegelt sich in der Größe des Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen wider [56]. In den DSC-Kühlkurven (siehe Abbildung 4.21, oben) zeigte sich, dass der Kristallisationspeak bei höheren Temperaturen hier unverändert blieb, da sich die Partikelgröße nicht veränderte. Der Einfluss des MPEG₂₀₀₀-DSPE wird dagegen bei der konventionellen Methode durch eine Verschiebung des zweiten Kristallisationspeaks mit der MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration zu höheren Temperaturen sichtbar (siehe Abschnitt 4.1.3). Ein solcher Trend war bei den inkubierten Proben nicht eindeutig zu erkennen. Bei den bei Raumtemperatur inkubierten Proben kam es unabhängig vom MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt zu einer einheitlichen Verschiebung des zweiten Kristallisationspeaks zu höheren Temperaturen. Bei den bei 60 °C inkubierten Proben war diese Verschiebung bei drei Dispersionen (4, 8 und 10 mol%-Probe) zu beobachten.

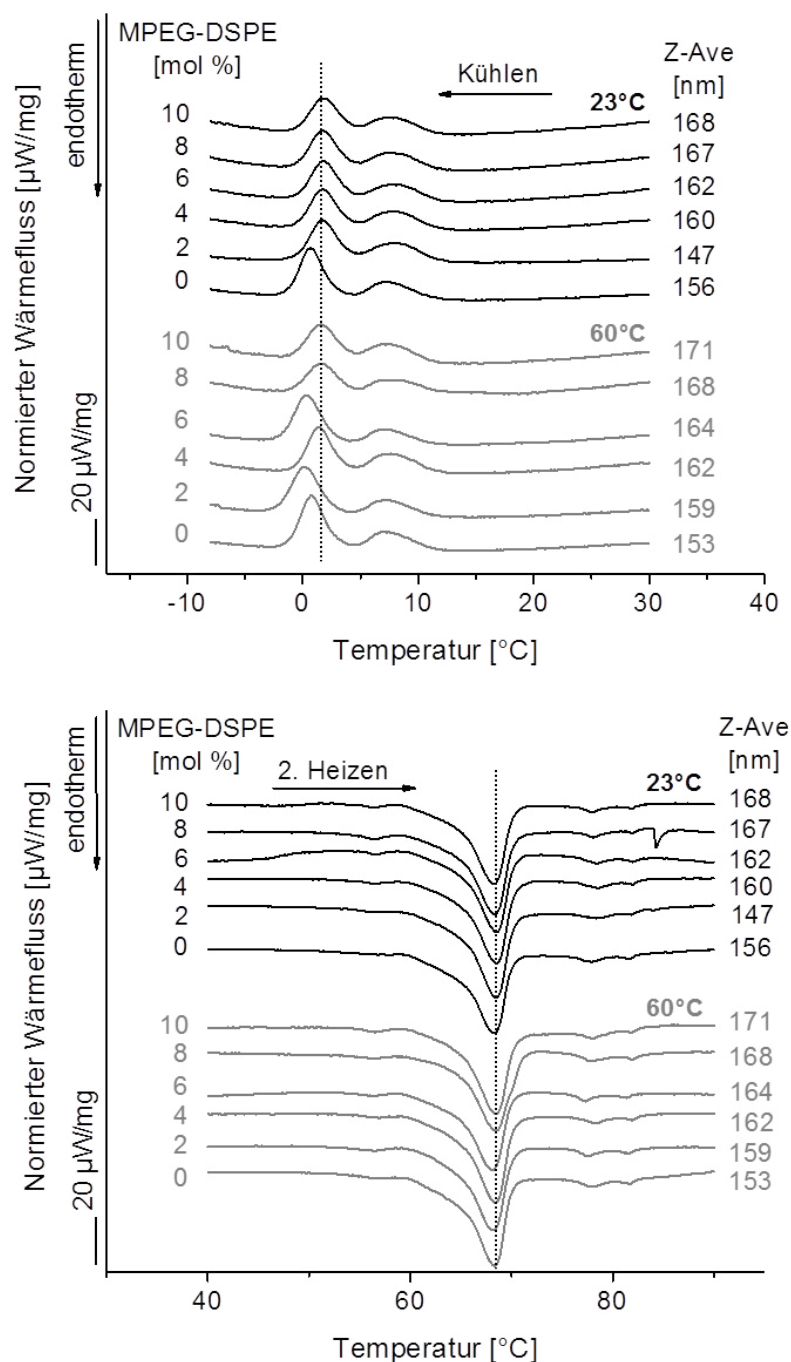


Abbildung 4.21: DSC-Kurven der mit S75 stabilisierten Dispersion 1 Woche nach der Inkubation (bei 23 °C bzw. 60 °C) mit steigenden Konzentrationen an MPEG₂₀₀₀-DSPE. Es sind Ausschnitte der Abkühlkurven (oben) und der anschließenden Heizkurven (unten) dargestellt. Die PCS *Z-Average* Partikelgrößen der jeweiligen Proben sind ebenfalls angegeben.

Bei den zwei anderen Dispersionen (2 und 6 mol%-Probe) verschob sich der Kristallisationspeak leicht zu niedrigeren Temperaturen. Ein solches Phänomen tritt z.B. bei

Phospholipid-Hydrolyse in den Dispersionen zusammen mit einer Verschiebung der flüssigkristallinen Übergängen zu niedrigeren Temperaturen auf. Schaut man sich bei diesen beiden Proben die flüssigkristallinen Übergänge an (siehe Abbildung 4.21, unten), so ist auch hier eine leichte Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen im Vergleich zu den anderen Proben zu erkennen. Die Verschiebung des zweiten Kristallisationspeaks könnte also tatsächlich durch eine etwas fortgeschrittenere Phospholipid-Hydrolyse verursacht sein (Inkubation bei 60 °C). Wie bei der konventionellen Herstellung zu erkennen war, ist eine Einlagerung von MPEG₂₀₀₀-DSPE außerdem an Veränderungen der flüssigkristallinen Übergänge zu erkennen, da diese schwächer werden bzw. sich auch zusammenschieben (siehe Abschnitt 4.1.3). Eine derartige Veränderung konnte bei den „*post-insertion*“ Proben nicht detektiert werden (siehe Abbildung 4.21, unten). Möglicherweise hat daher keine Einlagerung des MPEG₂₀₀₀-DSPE in die Partikelgrenzfläche durch die Inkubation stattgefunden. Denkbar wäre auch die Bildung einer weiteren Phospholipid-Lamelle um die Partikel, wie es von Schubert et al. für 5%-ige Lipidnanopartikel-Dispersionen, die mit höheren Lecithin-Konzentrationen (> 1,5% Lecithin bezogen auf die gesamte Dispersion) stabilisiert waren, diskutiert wurde [133]. Gegen die Annahme einer Nicht-Einlagerung des MPEG₂₀₀₀-DSPE bzw. einer Lamellen-Bildung spricht aber der Effekt auf den zweiten Kristallisationspeak. Daher wäre es auch denkbar, dass nur eine weniger weitgehende Einlagerung in die Grenzfläche stattgefunden haben könnte oder einfach eine zu geringe Einlagerung. Wie schon in Abschnitt 4.3.1 erwähnt, zeigen erste Untersuchungen von Kuntsche et al. zur nachträglichen PEGylierung von Cholesterylnonanoat-Partikeln ebenfalls nur eine geringe Einlagerung von MPEG₂₀₀₀-DSPE [145]. Nach Inkubation und anschließender Trennung der Partikel und freien MPEG₂₀₀₀-DSPE-Mizellen mittels asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung wurde z.B. nur eine etwas geringere Menge an intakten Mizellen wiedergefunden.

Eine Untersuchung des MPEG₂₀₀₀-DSPE Einflusses getrennt von dem Einfluss der Partikelgröße auf die Rekristallisation erwies sich als nicht durchführbar. Durch die starke Phospholipid-Hydrolyse während der Lagerung verschoben sich die flüssigkristallinen Übergänge so weit zu niedrigeren Temperaturen, dass sie mit dem Schmelzpeak zusammen fielen und daher der Gehalt an rekristallisiertem Cholesterylmyristat nicht eindeutig bestimmbar war. Weitere Untersuchungen sollten daher mit gepufferten Proben durchgeführt werden.

4.4 Poloxamer-stabilisierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel

Mit dem PEGylierten Phospholipid MPEG₂₀₀₀-DSPE lassen sich gut sterisch stabilisierte Partikel herstellen, die außerdem eine kleine Partikelgröße und geringe Rekristallisationstendenz aufweisen und autoklavierbar sind. Da das MPEG₂₀₀₀-DSPE allerdings sehr teuer ist, wurde untersucht, ob sich unter Verwendung des günstigeren Poloxamer 188 ebenso gute Ergebnisse erzielen lassen. Poloxamer 188 wird ebenfalls zur Verlängerung der Zirkulationszeit im Blut bei anderen Nanopartikeln verwendet [9].

Es wurde eine Dispersion hergestellt, die mit 1,6% Lipoid S100 und 6 mol% Poloxamer 188 (zusätzlich und bezogen auf die Menge an Phospholipid) stabilisiert war. Dabei wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von 8595 g/mol für Poloxamer 188 (Molekulargewicht 7680-9510 g/mol) angenommen. Des Weiteren wurde eine Dispersion hergestellt, die nur mit Poloxamer 188 stabilisiert war.

Um die sterische Stabilisierung der Partikel zu überprüfen, wurden wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben Stabilitätsuntersuchungen in Calciumchlorid-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen oder in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zur Neutralisation der Oberflächenladung durchgeführt.

Bei der Neutralisation der Oberflächenladung der mit S100 und 6 mol% Poloxamer 188 stabilisierten Probe durch Calciumchlorid war bei einer Konzentration von 0,156-2,5 mM CaCl₂ eine Zunahme der Partikelgröße und des Polydispersitätsindex zu beobachten.

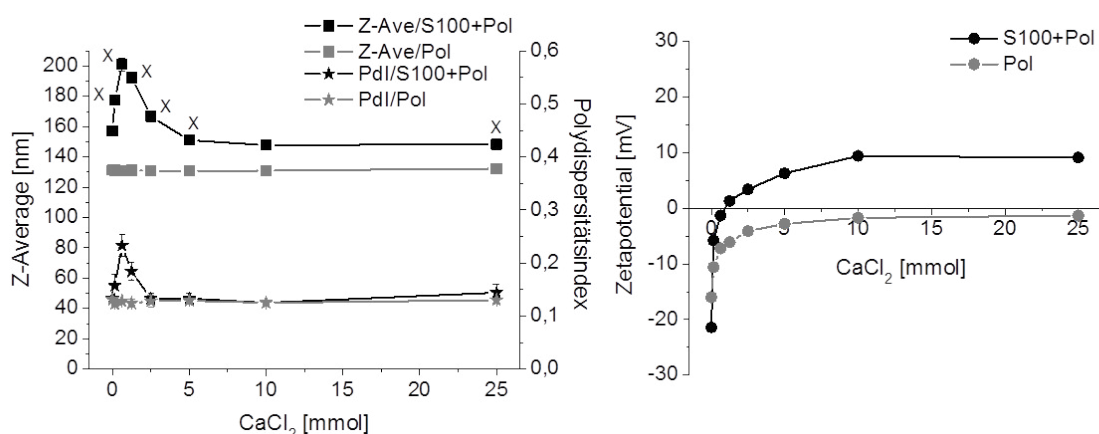


Abbildung 4.22: Z-Average-Durchmesser/Polydispersitätsindex (links) und Zetapotential (rechts) von Partikeln stabilisiert mit 2% Poloxamer 188 bzw. S100/6 mol% Poloxamer 188 in Abhängigkeit von der CaCl₂-Konzentration. Die Symbole wurden zur besseren Veranschaulichung verbunden. „X“ kennzeichnet die Anwesenheit von Partikeln im Mikrometerbereich.

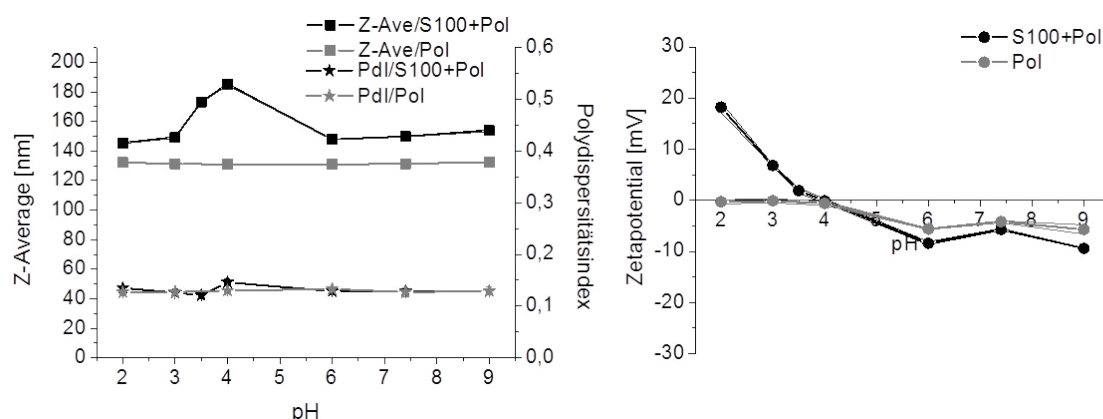


Abbildung 4.23: Z-Average-Durchmesser/Polydispersitätsindex (links) und Zetapotential (rechts) von Partikeln stabilisiert mit 2% Poloxamer 188 bzw. S100/6 mol% Poloxamer 188 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Symbole wurden zur besseren Veranschaulichung verbunden.

Ein Zetapotential von ungefähr 0 mV lag bei 0,625-1,25 mM CaCl_2 vor. Hier wurden außerdem Partikel im Mikrometerbereich detektiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Probe mit S100 und 6 mol% Poloxamer 188 keine ausreichende sterische Stabilisierung besaß. Oberhalb einer Konzentration von 1,25 mmol CaCl_2 kam es zur Ladungsumkehr und zur Zunahme des positiven Zetapotentials. Durch spezifische Interaktion der Calciumionen mit der Phosphatgruppe der Phospholipide kommt es zur Adsorption der Calciumionen an die Oberfläche der Partikel. Die elektrostatische Stabilisierung stieg wieder an und die Partikelgröße nahm daher ab. Bei der Variation des pH-Wertes wurde um pH 4 ein Zetapotential von ungefähr 0 mV erreicht. Hier kam es ebenfalls zur deutlichen Partikelgrößenzunahme, allerdings wurden keine Partikel im Mikrometerbereich detektiert. Unterhalb des Ladungsnullpunktes wurde ein positives Zetapotential aufgrund der Protonierung der Phosphatgruppe der Phospholipide gemessen. Durch die Oberflächenladung wurden die Partikel wieder stabilisiert und eine Partikelgrößenabnahme auf etwa die Ausgangsgröße detektiert. Das Verhalten der Probe mit S100 und 6 mol% Poloxamer 188 entspricht sowohl bei Variation des pH-Wertes als auch der CaCl_2 -Konzentration etwa dem der allein mit S100 stabilisierten Probe in Abschnitt 4.1.5.

Die Probe mit 2% Poloxamer 188 war dagegen sterisch stabilisiert und blieb über den gesamten Bereich der Calciumchlorid-Konzentration und des pH-Wertes stabil. Das Verhalten der allein mit Poloxamer stabilisierten Probe ähnelt dem der PEGylierten Probe in Abschnitt 4.1.5, nur dass keine Protonierung und damit Ladungsumkehr bei niedrigen pH-Werten stattfindet (siehe Abbildung 4.22). Auffällig ist, dass die allein mit Poloxamer 188 stabilisierte Probe ein negatives Zetapotential aufweist, obwohl Poloxamer 188 ein nichtionisches Tensid ist. Zu beachten ist, dass der Zetapotential-Wert der Probe mit 0 mmol CaCl_2 in hochgereinigtem Wasser mit einer niedrigen Konduktivität

(0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$) gemessen wurde, weshalb hier ein negativerer Wert (-16 mV) auftritt im Vergleich zu der Messung in TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4). In TRIS-Puffer beträgt das Zetapotential dieser Probe -6 mV. Ein negatives Zetapotential von mit nichtionischen Tensiden stabilisierten Partikeln ist allerdings nicht ungewöhnlich. Als Ursache wird in der Literatur eine Adsorption von Hydroxylionen aus dem Dispersionsmedium aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen an den Ether-Sauerstoff von Polyoxyethylen-Ketten diskutiert [150]. Für Poloxamer 188 (1,2%) stabilisierte Compritol-Nanopartikel werden z.B. Zetapotential-Werte von -25 mV (in destilliertem Wasser, Konduktivität eingestellt mit NaCl auf 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$) gemessen [151, 152].

Eine ausreichende sterische Stabilisierung kann demnach nicht nur durch PEGylierung der Partikel mit Hilfe PEGylierter Phospholipide erreicht werden, sondern auch durch Verwendung von Poloxamer 188 als alleinigem Stabilisator. Bei einer Kombination von S100 mit Poloxamer 188 wurde dagegen keine ausreichende Stabilisierung erreicht, evtl. war die hier verwendete Konzentration von 1,05% (m/m) bezogen auf die Dispersion zu gering.

4.5 Cholesterylmyristat-Nanopartikel mit positiv geladener Oberfläche

Nanopartikuläre Trägersysteme mit positiv geladener Oberfläche können mit Nukleinsäuren Komplexe bilden und werden daher z.B. in der Gentherapie erprobt. Um in einem ersten Versuch positiv geladene smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel herzustellen, wurde Lipoid S100 zusammen mit dem kationischen Lipid Distearyltrimethylammoniumbromid (DDAB, siehe Abbildung 3.4) verwendet.

4.5.1 Partikelgröße und Zetapotential

Direkt nach der Herstellung wurde ein *Z-Average* von $160,3 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$ und ein Polydispersitätsindex von $0,210 \pm 0,005$ für die Dispersion mit 8 mol% DDAB (0,10% bezogen auf die Dispersion) gemessen bzw. für die Dispersion mit 12 mol% DDAB (0,15% bezogen auf die Dispersion) betrug der *Z-Average* $171,0 \pm 1,0 \text{ nm}$ und der Polydispersitätsindex $0,199 \pm 0,008$. Das Zetapotential der beiden Proben wurde mit zunehmendem DDAB-Gehalt positiver und lag bei $+16,5 \pm 1,1 \text{ mV}$ für 8 mol% DDAB und bei $+22,5 \pm 0,7 \text{ mV}$ für 12 mol% DDAB. Im Vergleich dazu liegt das Zetapotential für nur mit S100 stabilisierte Partikel bei etwa -4 mV direkt nach der Herstellung. Während der Lagerung kam es auch in diesen Proben zur Phospholipid-Hydrolyse, so dass das positive Zetapotential abnahm. Das Zetapotential sank z.B. für die Probe mit 8 mol% auf etwa $+5 \text{ mV}$ nach einem Monat Lagerung. Um eine dauerhaft positive Oberflächenladung zu erhalten, müssen diese Systeme ebenfalls gepuffert werden. Hinsichtlich einer guten Stabilisierung von Dispersionen wird ein Zetapotential von über $\pm 30 \text{ mV}$ vorgeschlagen oder eine ausreichende sterische Stabilisierung [3, 152]. Vermutlich könnte ein entsprechendes Zetapotential durch den Einsatz höherer DDAB-Konzentrationen erzielt werden. Zum Beispiel stellten Tabatt et al. 4%-ige Lipidnanopartikel-Dispersionen stabilisiert mit einer Mischung aus Span 85 und Tween 80 her, die außerdem 1% (m/m) eines kationischen Lipides zur Oberflächenmodifikation enthielten [103]. Die erzielten Zetapotential-Werte lagen vor der Beladung mit DNA bei $+35$ bis $+45 \text{ mV}$. Für die Dispersion mit dem kationischen Lipid DDAB wurde ein Zetapotential von $+36,7 \text{ mV}$ gemessen. Es ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich dieser Zetapotential-Werte mit denen der smektischen Partikel in dieser Arbeit aufgrund unterschiedlicher Messbedingungen nicht möglich ist. Alle von Tabatt et al. untersuchten Systeme zeigten eine gesteigerte in vitro Transfektion verglichen mit freier DNA, so dass in diesem Fall die Größenordnung des Zetapotentials für die Komplexierung von DNA ausreichend war. Allerdings ist die Effektivität auch abhängig von der Art der Lipidma-

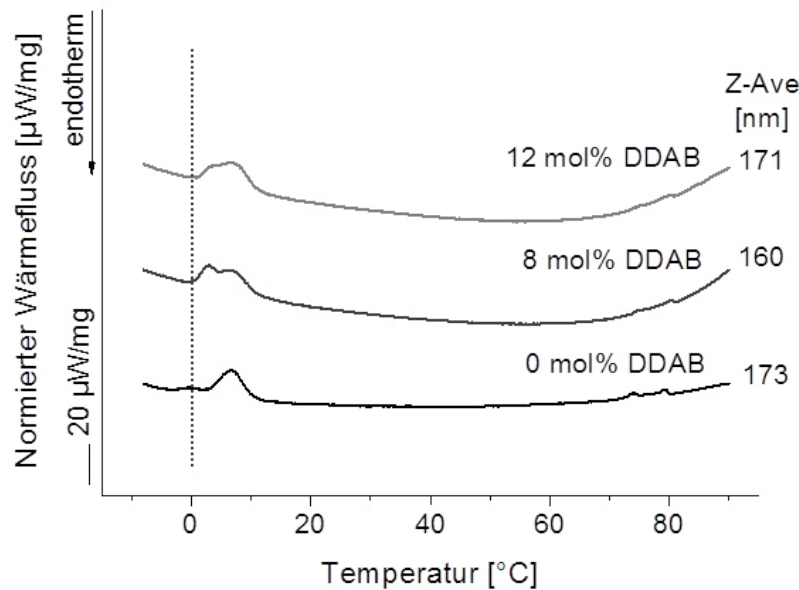


Abbildung 4.24: DSC-Kühlkurven der mit S100 und 0, 8 und 12 mol% DDAB stabilisierten Proben direkt nach der Herstellung. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Position des zweiten Kristallisationspeaks der nur mit S100 stabilisierten Probe.

trix und des eingesetzten kationischen Lipides. Das kationische Lipid DOTAP zeigte z.B. eine signifikant höhere Effektivität bei der Transfektion [103].

4.5.2 Phasenverhalten

Mittels DSC wurde direkt nach der Herstellung das Phasenverhalten untersucht. Die DSC-Kurven des Kühlvorgangs zeigen deutlich, dass durch die Einlagerung des DDAB in die Grenzfläche die flüssigkristallinen Übergänge schwächer werden (Abbildung 4.24). Die beiden Kristallisationspeaks sind bei den DDAB-haltigen Proben nicht vollständig voneinander getrennt, trotzdem kann man erkennen, dass der zweite Kristallisationspeak im Vergleich zu der Probe ohne DDAB (siehe gestrichelte Linie) zu höheren Temperaturen verschoben ist. Dies ist wahrscheinlich ähnlich wie bei den mit MPEG₂₀₀₀-DSPE PEGylierten Partikeln auf die gesättigten Alkyl-Ketten des DDAB zurückzuführen.

4.6 Elektronenspinresonanz-Untersuchungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Untersuchungen Informationen über die Eigenschaften der unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel auf molekularer Ebene wie z.B. mögliche Interaktionsarten mit anderen Substanzen zu erhalten. Für Elektronenspinresonanz-Untersuchungen werden Spinsonden in die zu untersuchenden Systeme inkorporiert. Durch den Einsatz von Spinsonden mit unterschiedlicher Struktur kann z.B. die Verteilung der Spinsonden in den Dispersionen und die lokale Umgebung der Spinsonden untersucht werden. Mit Hilfe eines Ascorbinsäure-Reduktionsassay können Hinweise auf die Zugänglichkeit der Spinsonden von der Wasserphase aus gewonnen werden [128].

4.6.1 Elektronenspinresonanz (ESR)

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie wird oft auch als paramagnetische Elektronenresonanzspektroskopie bezeichnet (*electron paramagnetic resonance*, „EPR“). Bei der ESR wird ähnlich wie bei der NMR die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und magnetischen Momenten untersucht. Bei der NMR handelt es sich um die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und dem magnetischen Moment der Kerne (Kernspin), bei der ESR um die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und den Elektronen (Elektronenspin). Voraussetzung für eine ESR-Messung ist, dass die zu untersuchende Probe ein permanentes magnetisches Moment aufweist (ungepaartes Elektron). Solche paramagnetischen Moleküle werden als Spinsonden bezeichnet und können z.B. stabile Nitroxidradikale sein. Sie werden für die Messungen in das zu untersuchende System eingebracht [128].

Das Prinzip der ESR ist die resonante Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen, die sich in einem von außen angelegten Magnetfeld befinden. Es kommt zur sogenannten Zeemann-Aufspaltung (Abbildung 4.25), d.h. für die ungepaarten Elektronen gibt es zwei Möglichkeiten der Spin- bzw. Magnetfeldorientierung. Sie können sich parallel zum Magnetfeld (Grundzustand) oder antiparallel (angeregter Zustand) ausrichten. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen ist abhängig von der Magnetfeldstärke. Wird die Probe mit Mikrowellen einer bestimmten Frequenz bestrahlt, so dass die Energie der Mikrowellenstrahlung der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen entspricht, kommt es zur Resonanz und die Elektronen gehen in den angeregten Zustand über. Durch die erste Ableitung des aufgezeichneten Absorptionsspektrums erhält man das ESR-Spektrum. Dieses weist bei den hier verwendeten Sonden statt nur einer Resonanzlinie drei Resonanzlinien auf, da es aufgrund der Interaktion zwischen ungepaarten

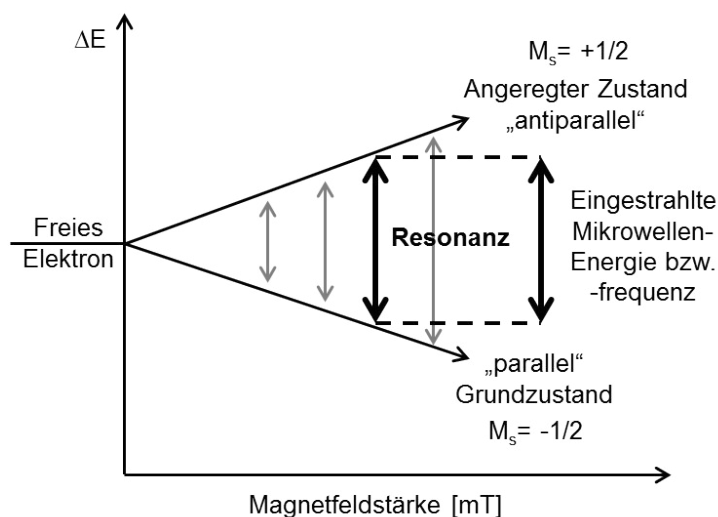


Abbildung 4.25: Energieniveaus für ein Elektron in einem äußeren Magnetfeld (Zeemann-Aufspaltung)

Elektronen und magnetischen Kernen im Molekül zu Mehrfachresonanzen und somit zu einer Hyperfeinaufspaltung in drei Linien kommt (Abbildung 4.26) [128, 153].

Das ESR-Spektrum liefert Informationen über die Mikroviskosität (molekulare Mobilität) und Mikropolarität der Umgebung der ESR-Sonde (Umgebung der Nitroxid-Gruppe der Sonde). Eine Aussage über die Mikropolarität erhält man über die Hyperfeinkopplungskonstante a_N . Sie entspricht dem Abstand zwischen den Resonanzlinien in mTesla (Abbildung 4.26). Dieser Abstand ist polaritätsabhängig und reicht von 1,4 mT (sehr

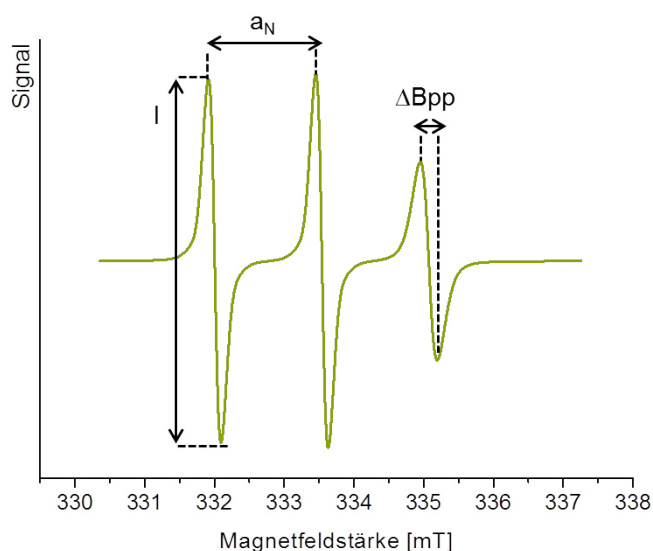


Abbildung 4.26: ESR-Spektrum mit einer Hyperfeinaufspaltung in drei Resonanzlinien. Die Hyperfeinkopplungskonstante a_N entspricht dem Abstand zwischen den Resonanzlinien in mTesla. Weitere Parameter: Signalamplitude (I) und Peak zu Peak Linienbreite (ΔB_{pp}).

lipophile Umgebung) bis 1,7 mT (sehr polare Umgebung) [154]. Die Linienbreite gibt Hinweise auf die Mikroviskosität. Befindet sich die Sonde in einer viskosen Umgebung, wird ihre Bewegung eingeschränkt und es kommt zu einer Verbreiterung der Linien, insbesondere der Hochfeldlinie [153]. In Abbildung 4.27 ist die Linienverbreiterung und die daraus resultierende Abnahme der Signalamplitude an den ESR-Spektren der Sonde 3 β -Doxyl-5 α -Cholestan (DChol) inkorporiert in eine Miglyol-Emulsion bzw. in hochviskose smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikeln zu erkennen. Eine hohe lokale Konzentration kann ebenfalls aufgrund von Spin-Austausch Prozessen zu einer Linienverbreiterung führen [36]. Die Linienverbreiterung betrifft hier alle drei Linien gleichmäßig. Dies ist in Abbildung 4.27 anhand einer Lösung der ESR-Sonde DChol in Chloroform/Methanol (1:1) dargestellt. Die Lösung ist mit 0,15% im Vergleich zu den Nanopartikeln und der Emulsion mit 0,004% „hochkonzentriert“. Ohne Spin-Austausch Prozesse würde man schmale Resonanzlinien wie in Abbildung 4.26 erhalten. Anhand des ESR-Spektrums können weitere Parameter wie die Signalamplitude der Peaks und die Peak zu Peak Linienbreite bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Parameter kann wiederum die Rotationskorrelationszeit t_c berechnet werden, die etwas über die Dynamik der Nitroxid-Gruppe aussagt; je kleiner t_c , desto beweglicher ist die Sonde [128, 155, 156]. In Wasser liegt z.B. die Rotationskorrelationszeit der Spinsonde ATI (4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-oxyl) bei einer Größenordnung von 0,05 ns und in MCT (mittelkettige Triglyceride)

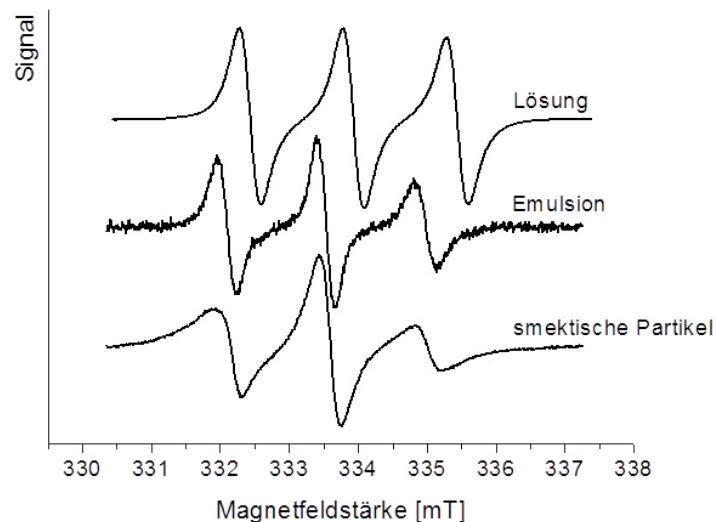


Abbildung 4.27: ESR-Spektren der Sonde DChol eingearbeitet in smektische Nanopartikel (5% CM, 5% Poloxamer 188, 0,004% DChol), in eine Nanoemulsion (5% Miglyol, 5% Poloxamer 188, 0,004% DChol) bzw. gelöst in einer 1:1 Mischung aus Chloroform und Methanol (DChol-Konzentration 0,15%). Das Spektrum der Emulsion zeigt ein größeres Rauschen der Basislinie, da bei der Vermessung der Probe eine kürzere Scandauer (120 Sekunden) verwendet wurde.

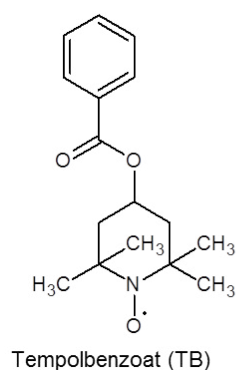
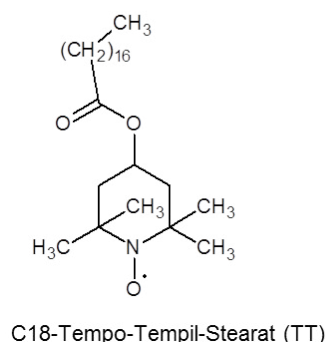
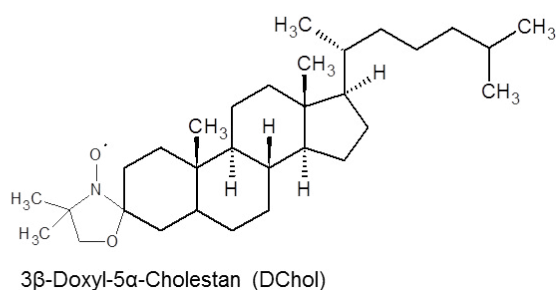
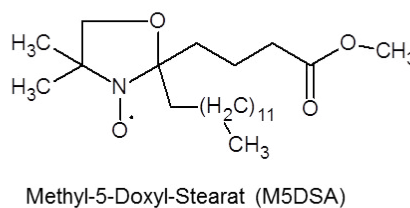
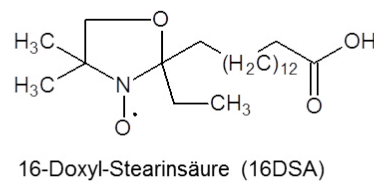
bei 0,45 ns bzw. in PEG 400 bei 0,85 ns [153]. Für die in dieser Arbeit verwendete Sonde 3 β -Doxyl-5 α -Cholestan (DChol) beträgt die Rotationskorrelationszeit in Lösung (Chloroform/Methanol 1:1) 0,054 ns, in einer Miglyol-Emulsion 0,33 ns und in smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln 0,94 ns (Abbildung 4.27). Zusätzliche Information über die Lokalisation der Spinsonde kann man durch ein Ascorbinsäure-Reduktionsassays erhalten. Durch Zugabe von Ascorbinsäure in die Wasserphase werden alle Nitroxid-Gruppen der Spinsonden reduziert, die sich an der Partikelgrenzfläche oder in der Wasserphase befinden [36]. Die durch die Reduktion entstehenden Hydroxylamin-Gruppen sind nicht mehr paramagnetisch, so dass es zu einer Intensitätsabnahme des ESR-Signals kommt.

4.6.2 Eigenschaften der ESR-Sonden

Die ESR-Sonden (Abbildung 4.28) wurden in Hinblick auf ihre möglichen Lokalisationen in den unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln ausgewählt, mit dem Ziel, nähere Informationen über die Eigenschaften der Lipidmatrix wie auch der Grenzfläche der Partikel zu erhalten. Um eine Inkorporierung in die Lipidmatrix zu erreichen, wurden möglichst lipophile ESR-Sonden mit einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit zum Matrixlipid ausgesucht. Da es sich beim Cholesterylmyristat um einen Fettsäureester des Cholesterol handelt, wurden sowohl eine Sonde mit Cholestan-Grundgerüst (3 β -Doxyl-5 α -Cholestan (DChol)) als auch spinmarkierte Fettsäure-Derivate (C18-Tempo-Tempil-Stearat (TT), 16-Doxylstearinsäure (16DSA), Methyl-5-Doxyl-Stearat (M5DSA)) ausgewählt. Die ESR-Sonden mit Fettsäure-Kette unterschieden sich in der Positionierung der Nitroxid-Gruppe im Molekül. Tempolbenzoat ist dagegen eine lipophile ESR-Sonde, für die eine bevorzugte Grenzflächenlokalisation, z.B. bei festen Lipidnanopartikeln, beobachtet wurde [36]. Da die unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel ein Trägersystem für lipophile Arzneistoffe darstellen sollen, können die ESR-Sonden auch als „Modell-Arzneistoffe“ betrachtet werden und die ESR-Untersuchungen können Hinweise auf deren voraussichtliche Verteilung im Trägersystem geben.

4.6.3 Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der untersuchten Systeme

Der *Z-Average*-Durchmesser der unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel lag bei 112-130 nm und der Polydispersitätsindex bei 0,125-0,140. Für die Miglyol-Emulsion wurde ein *Z-Average*-Durchmesser von 73 nm und ein Polydispersitätsindex von

**TEMPO-Derivate
(2,2,6,6,-Tetramethyl-Piperidin-N-oxyle)****Doxyl-Derivate
(4,4-Dimethyl-Oxazolidin-N-oxyle)****Abbildung 4.28:** Für die ESR-Untersuchungen ausgewählte ESR-Sonden.

0,064 ermittelt. Die sehr kleine Partikelgröße der Nanoemulsion ist auf die geringe Viskosität der Miglyol-Phase bei den hohen Temperaturen während der Herstellung zurückzuführen. Durch die geringe Viskosität lässt sich die Fettphase viel leichter während des Homogenisationsprozesses dispergieren. Selbst bei 20 °C weist Miglyol schon eine niedrige Viskosität von 0,03 Pa*s auf [157], die mit steigenden Temperaturen noch weiter abnimmt. Im Vergleich dazu beträgt die Viskosität von smektischen Cholesterylmyristat-Dispersionen ungefähr 5 Pa*s bei 60 °C und 0,05 Pa*s in der isotropen Phase bei 88 °C [1]. Aus diesem Grund können unter denselben Herstellungsbedingungen für die Cholesterylmyristat-Nanopartikel nicht so kleine Partikelgrößen erzielt werden wie für die Miglyol-Emulsion.

4.6.4 ESR-Untersuchungen an unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln

Ziel der Untersuchungen war es, die Verteilung und Beweglichkeit der ESR-Sonden in den Systemen und die Eigenschaften der lokalen Umgebung der Sonden zu untersuchen. Die Lokalisation der Sonde in den Systemen kann durch Computersimulation der ESR-

Spektrallinienform bestimmt werden. Im Computerprogramm wird die Überlagerung verschiedener Spektren, die mit Umgebungen unterschiedlicher Polarität der Nitroxid-Gruppe korrelieren, geprüft und ein Fit aus den Simulationskurven der möglichen Umgebungen ermittelt. Die aufgenommenen Spektren wurden mit 2 Spezies (Aufenthaltsmöglichkeiten der Sonde) simuliert. In Abbildung 4.29 sind die ESR-Spektren und simulierten Kurven für die Sonden C18-Tempo-Tempil-Stearat, 16-Doxylstearinsäure, Methyl-5-Doxyl-Stearat und 3 β -Doxyl-5 α -Cholestan dargestellt.

Die Simulation des ESR-Spektrums der C18-Tempo-Tempil-Stearat-Probe (A) ergab einen ungefähren Anteil von 76% Spezies 1 und 24% Spezies 2 (Tabelle 4.2). Spezies 1 befindet sich wahrscheinlich in der Lipidmatrix. Die Hyperfeinkopplungskonstante ist sehr klein ($a_N = 1,45$ mT) und die Linien, insbesondere die Hochfeldlinie, ist stark verbreitert, was auf eine sehr lipophile und viskose Umgebung der Nitroxid-Gruppe von C18-Tempo-Tempil-Stearat hinweist. Bei Spezies 2 ist die Hyperfeinkopplungskonstante größer ($a_N = 1,58$ mT), aber immer noch in einem eher lipophilen Bereich verglichen mit Literaturangaben. Jores et al. fanden z.B. in einem System mit Poloxamer 188 stabilisierten Glycerolbehenat-Partikeln eine Hyperfeinkopplungskonstante von 1,51-1,58 mT für den sich in der Lipidmatrix befindenden Anteil der ESR-Sonde Tempolbenzoat. Für Tempolbenzoat, das sich in einer polaren Umgebung auf der Oberfläche dieser Partikel befand, betrug die Hyperfeinkopplungskonstante 1,65-1,68 mT [36]. Aufgrund der hier gefundenen Hyperfeinkopplungskonstante von 1,58 mT für Spezies 2 könnte man annehmen, dass die Nitroxid-Gruppe sich an der Partikelgrenzfläche befindet, aber nicht in die Wasserphase ragt. Bei beiden Spezies weist außerdem die Rotationskorrelationszeit von 0,85 bzw. 0,71 ns auf eine eingeschränkte Beweglichkeit aufgrund der viskosen Umgebung hin.

Bei der 16-Doxylstearinsäure-Probe (B) liegt der Anteil der Spezies 1 bei 95% und der von Spezies 2 bei 5%. Spezies 1 befindet sich anscheinend in der Lipidmatrix ($a_N = 1,43$ mT) und Spezies 2 in der Grenzfläche ($a_N = 1,61$ mT). Die Beweglichkeit der Sonde ($t_c = 0,94$ ns bzw. 1,00 ns) ist noch etwas eingeschränkter als bei der Sonde C18-Tempo-Tempil-Stearat. Eine mögliche Ursache für die eingeschränktere Beweglichkeit könnte die Position der Nitroxid-Gruppe im Molekül als auch die Molekülkonformation sein. Bei der Sonde C18-Tempo-Tempil-Stearat sitzt die Nitroxid-Gruppe direkt an der Carboxyl-Kopfgruppe, die wahrscheinlich zur Grenzfläche orientiert ist, wohingegen die Alkyl-Kette senkrecht in das Innere der Lipidphase ragt. Im Molekül der 16-Doxylstearinsäure befindet sich die Nitroxid-Gruppe hingegen fast am Ende der Fettsäurekette und es könnte, wie von Berton-Carabin et al. beschrieben, mehrere Konformationen der Sonde in der Grenzfläche geben [158]. Zum einen könnten die polaren Gruppen (Carboxyl-Gruppe und Doxyl-Ring) mit den polaren Regionen der Grenzfläche assoziiert sein, wobei die Sonde entweder in einer gestreckten (parallel zur Grenzfläche) oder in einer gebeugten Konformation (Krümmung der

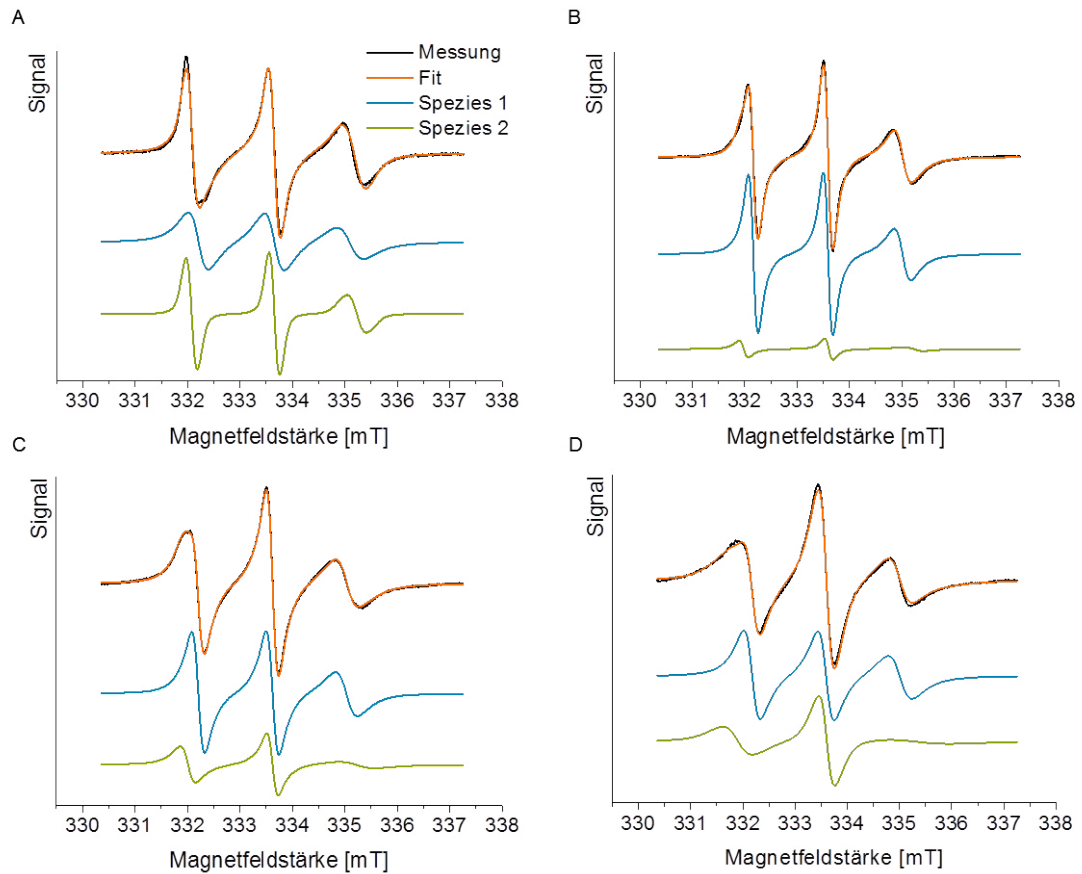


Abbildung 4.29: ESR-Spektren und deren Simulation für CM-Dispersionen mit den Sonden C18-Tempo-Tempil-Stearat (A), 16-Doxylstearinsäure (B), Methyl-5-Doxyl-Stearat (C), 3β-Doxyl-5α-Cholestan (D).

Alkyl-Kette in Richtung Lipidmatrix) vorliegt, wodurch die Beweglichkeit eingeschränkter ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass nur die Carboxyl-Gruppe in der Grenzfläche lokalisiert und die Alkyl-Kette mit dem Doxyl-Ring senkrecht zur Grenzfläche angeordnet ist. In dieser Anordnung würde die Sonde aber vermutlich eine kleinere Hyperfeinkopplungskonstante und eine etwas größere Beweglichkeit aufweisen.

Bei der Methyl-5-Doxyl-Stearat-Probe (C) befinden sich ca. 71% der Sonde in der Lipidmatrix ($a_N = 1,42$ mT) und ca. 29% in der Partikelgrenzfläche ($a_N = 1,61$ mT). Die Beweglichkeit der Sonde ist noch geringer als bei der 16-Doxylstearinsäure ($t_c = 1,12$ ns bzw. 2,41 ns). Da die Nitroxid-Gruppe der Sonde nicht am Ende des Moleküls sitzt, sondern am C5, könnte es sein, dass die restliche Kette gebeugt ist (gebeugte Konformation) und die Beweglichkeit der Sonde zusätzlich behindert. Die Nitroxid-Gruppe befindet sich dabei in der Grenzfläche und die Alkyl-Kette ist in Richtung Lipidmatrix orientiert (Spezies 2) bzw. die Sonde ist vollständig in gebeugter Konformation in der Lipidmatrix lokalisiert (Spezies 1).

Tabelle 4.2: ESR-Parameter aus den simulierten ESR-Spektren der verschiedenen Sonden in den CM-Dispersionen. * C18-Tempo-Tempil-Stearat (TT), 16-Doxylstearinsäure (16DSA), Methyl-5-Doxyl-Stearat (M5DSA), 3ß-Doxyl-5α-Cholestan (DChol)

ESR-Sonde *	a_N [mT]	t_c [ns]	Anteil [%]
	Spez. 1 / Spez. 2	Spez. 1 / Spez. 2	Spez. 1 / Spez. 2
TT	1,45 / 1,58	0,85 / 0,71	76 / 24
16DSA	1,43 / 1,61	0,94 / 1,00	95 / 5
M5DSA	1,42 / 1,61	1,12 / 2,41	71 / 29
DChol	1,42 / 1,71	0,94 / 4,07	61 / 39

Die Simulation der 3ß-Doxyl-5α-Cholestan-Probe (D) ergab einen Sonden-Anteil von ungefähr 61% in der Lipidmatrix ($a_N = 1,42$ mT). Die Hyperfeinkopplungskonstante der Spezies 2 liegt mit 1,71 mT deutlich im sehr polaren Bereich. Die Spezies 2 ist außerdem nicht mehr beweglich ($t_c = 4,07$ ns), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Sonde sich in der Wasserphase befindet und ausgefallen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich alle Sonden bevorzugt in der Lipidmatrix aufhalten (Tabelle 4.2). Die Sonde 16-Doxylstearinsäure wurde mit 95% am besten in die Lipidmatrix inkorporiert.

4.6.5 ESR-Untersuchungen an einer Miglyol-Emulsion

Da die Sonde 16-Doxylstearinsäure am besten in die Lipidmatrix inkorporiert werden konnte, wurde diese Sonde zum Vergleich außerdem in eine Miglyol-Emulsion inkorporiert. Das ESR-Spektrum der Miglyol-Emulsion konnte mit einer einzigen Spezies simuliert werden. Die Simulation in Abbildung 4.30 zeigt, dass sich die Sonde vollständig in der Lipidphase ($a_N = 1,42$ mT) aufhielt. Die kurze Rotationskorrelationszeit von ca. 0,33 ns deutet auf eine hohe Beweglichkeit der ESR-Sonde hin und es kann daher angenommen werden, dass die ESR-Sonde fast vollständig gelöst in der Ölphase vorlag. Im Vergleich zu den smektischen Partikeln, die nur eine geringfügig niedrigere Aufnahmekapazität für 16-Doxylstearinsäure aufwiesen, war die Beweglichkeit der Sonde in der Miglyol-Phase deutlich höher aufgrund der viel niedrigeren Viskosität des Miglyols (0,03 Pa*s, bei 20 °C [157]). In der smektischen Phase betrug die Rotationskorrelationszeit von 16-Doxylstearinsäure ca. 0,94 ns. Bulk-Cholesterylmyristat ist in der smektischen Phase hochviskos und besitzt eine Viskosität von ca. 5 Pa*s bei 60 °C [1].

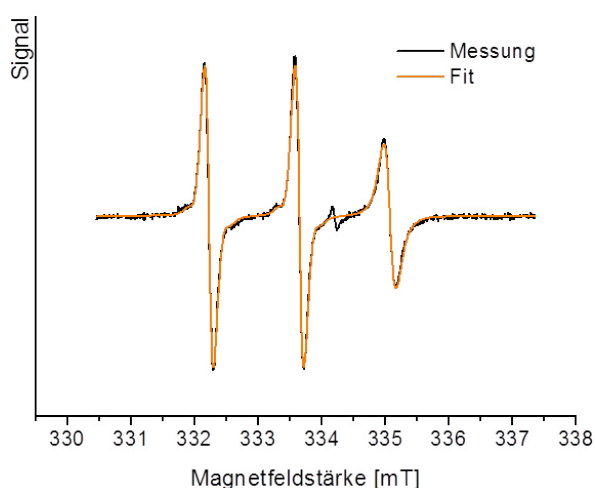


Abbildung 4.30: Simulation des ESR-Spektrums der Miglyol-Emulsion mit der Sonde 16-Doxylstearinsäure. Der kleine Zacken vor der Hochfeldlinie stammt von einer Verunreinigung des Führrungsrohres mit deuteriertem Tri-Aryl-Methyl-Radikal (dTAM), das zur internen Kalibrierung verwendet wird.

4.6.6 Ascorbinsäure-Reduktionsassay

Mit dem Ascorbinsäure-Reduktionsassay (Abbildung 4.31A) wurde untersucht, wie zugänglich die Nitroxid-Gruppe von der Wasserphase aus ist, also wie gut die ESR-Sonden in der Lipidmatrix bzw. Grenzfläche der Partikel geschützt sind. Dafür wurden die jeweiligen Dispersionen mit 20 mM Natrium-Ascorbat-Lösung inkubiert. Da Natrium-Ascorbat hydrophil ist, hält es sich in der Wasserphase auf und reduziert alle Nitroxid-Gruppen, die von der Wasserphase aus zugänglich sind. Die Nitroxid-Gruppen werden zum Hydroxylamin reduziert, welches nicht paramagnetisch ist und daher kein ESR-Signal mehr erzeugt [36, 128, 156]. Mit der 3β -Doxyl- 5α -Cholestan-Dispersion konnte kein Reduktionsassay durchgeführt werden, da die ESR-Signale bei der notwendigen kürzeren Messdauer zu breit und undeutlich waren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die ESR-Sonde Tempolbenzoat (TB) in Systemen mit festen Lipidnanopartikeln schnell reduziert wird, da Tempolbenzoat sowohl größtenteils an der Oberfläche der Partikel lokalisiert ist als auch eine hohe Beweglichkeit innerhalb der Partikel besitzt und daher schnell zur Oberfläche diffundiert [36]. Um zu untersuchen, ob Tempolbenzoat eingearbeitet in unterkühltsmeaktische Cholesterylmyristat-Nanopartikel ebenfalls von der Wasserphase aus leicht zugänglich ist, wurde neben den Systemen mit den ESR-Sonden C18-Tempo-Tempil-Stearat (TT), 16-Doxylstearinsäure (16DSA), Methyl-5-Doxyl-Stearat (M5DSA) auch ein System mit Tempolbenzoat (TB) untersucht.

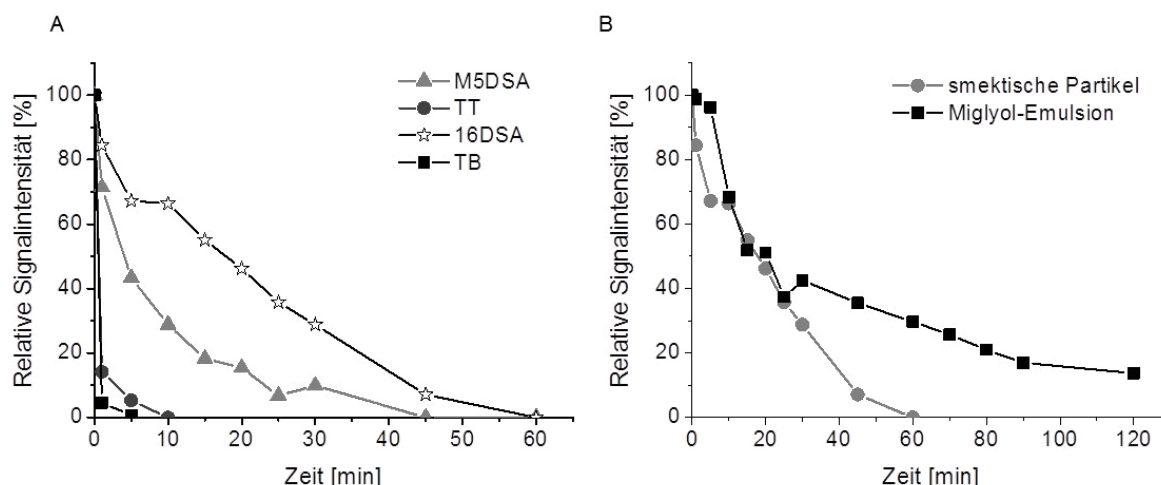


Abbildung 4.31: Ascorbinsäure-Reduktionsassay (Einzelmessungen) der CM-Dispersionen mit verschiedenen Sonden* (A) und mit der Sonde 16-DSA in einer Miglyol-Emulsion im Vergleich zu einer CM-Dispersion (B).

* C18-Tempo-Tempil-Stearat (TT), 16-Doxylstearinsäure (16DSA), Methyl-5-Doxyl-Stearat (M5DSA), Tempolbenzoat (TB).

Die Untersuchung zeigte, dass die in Cholesterylmyristat-Nanopartikel eingearbeiteten Sonden Tempolbenzoat und C18-Tempo-Tempil-Stearat nach 5 bzw. 10 Minuten komplett reduziert und daher von der Wasserphase aus gut zugänglich waren. Der in der Grenzfläche sitzende Anteil der Sonden sollte als erstes reduziert werden. Allerdings scheint der Anteil der Sonden in der Lipidmatrix noch so beweglich zu sein, dass er rasch zur Grenzfläche diffundiert und dort ebenfalls reduziert wird (z.B. $t_c = 0,85$ ns für C18-Tempo-Tempil-Stearat). Im Gegensatz dazu wurde bei der Sonde Methyl-5-Doxyl-Stearat erst nach 45 min kein ESR-Signal mehr detektiert. Die Ursache könnte eine stärkere Immobilisierung der Sonde in der Lipidmatrix sein (Spezies 1: $t_c = 1,12$ ns). Die ESR-Sonde 16-Doxylstearinsäure zeigte mit ungefähr 60 min die langsamste Reduktion und war daher von allen untersuchten Sonden am besten in den Cholesterylmyristat-Partikeln geschützt. Dies stimmt auch mit dem Simulationsergebnis, einer fast vollständigen Inkorporierung der ESR-Sonde in der Lipidmatrix (ca. 95%), überein. Ahlin et al. beobachteten an festen Lipidnanopartikel-Dispersionen, dass die Reduktionsgeschwindigkeit von der Lipophilie und der Struktur der Sonde sowie der Position der Nitroxid-Gruppe im Molekül abhängig ist [159]. Eine ähnliche Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit auch gemacht werden. Die Reduktionsgeschwindigkeit nahm in Abhängigkeit der Position der Nitroxid-Gruppe in der Reihenfolge $TT < TB < M5DSA < 16DSA$ ab. Bei den Sonden TT und TB sitzt der Doxyl-Ring mit der Nitroxid-Gruppe direkt an der Carboxyl-Gruppe und ist daher näher an der Grenzfläche lokalisiert. Wohingegen der Doxyl-Ring mit der Nitroxid-Gruppe bei der Sonde M5DSA an der Position 5 der Acyl-Kette sitzt und bei der Sonde

16DSA an der Position 16 und die Nitroxid-Gruppe daher weiter von der Grenzfläche entfernt ist.

Das Reduktionsassay wurde danach mit der Sonde 16-Doxylstearinäure in einer Miglyol-Emulsion durchgeführt, um zu untersuchen, ob die ESR-Sonde besser in den smektischen Cholesterylmyristat-Partikeln oder in der Emulsion geschützt ist (Abbildung 4.31B). Die Messergebnisse zeigten eine ähnliche Reduktionsgeschwindigkeit der Sonde in der Emulsion innerhalb der ersten 25 Minuten im Vergleich zu den smektischen Partikeln. Danach verlangsamte sich aber die Reduktion in der Emulsion und selbst nach 2 Stunden konnten noch 14% der Sonde detektiert werden. Der hoch viskose Zustand der smektischen Phase scheint daher, zumindest für diese Sonde, keinen Vorteil gegenüber dem flüssigen Zustand der Lipidphase in der Emulsion zu besitzen. Das Ergebnis ist erstaunlich, da 16-Doxylstearinäure in der Emulsion eine deutlich höhere Mobilität ($t_c = 0,33$ ns) als in den smektischen Partikeln aufweist und Emulsionen in der Regel auch nicht für eine verzögerte Freisetzung geeignet sind. Allerdings passt die langsamere Reduktion in der Nanoemulsion zu den Ergebnissen von Jores et al., bei denen für die ESR-Sonde Tempolbenzoat ebenfalls eine langsamere Reduktion in der Nanoemulsion im Vergleich zu festen Lipidnanopartikeln beobachtet wurde [36].

4.6.7 Transferuntersuchungen mit Lipofundin[®] MCT 20%

Da die unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel ein Trägersystem für lipophile Arzneistoffe darstellen sollen und die ESR-Sonden Arzneistoffe mit einer ähnlichen Lipophilie und Struktur repräsentieren können, ist nicht nur die Verteilung der Sonden in den Systemen interessant, sondern auch ihre Freisetzung aus den Partikeln nach der Applikation. Daher wurde in einem ersten Versuch der Transfer einer ESR-Sonde aus den smektischen Cholesterylmyristat-Lipidnanopartikeln in ein lipophiles Akzeptormedium untersucht. Hierfür wurde eine 5%-ige Dispersion mit einer 20%-igen Fetteulsion (Lipofundin[®] MCT 20%) im Verhältnis 2:1 gemischt. Dadurch wurde ein Lipidphasenverhältnis von ungefähr 1:2 erhalten. Als Sonde wurde C18-Tempo-Tempil-Stearat verwendet, da die bisherigen ESR-Ergebnisse eine gewisse Beweglichkeit der Sonde in der Lipidmatrix und schnelle Diffusion zur Grenzfläche zeigten. Aus diesem Grund sollte auch ein Transfer der Sonde in ein lipophiles Akzeptormedium möglich sein. Für den Ausgangswert wurde die Probe 2:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Nach dem Mischen mit Lipofundin[®] wurde die Probe zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Durch Simulation der ESR-Messkurven können die Spektren der zwei Spezies zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt werden. Zum Ausgangszeitpunkt stellt die Spezies 1 den Anteil an

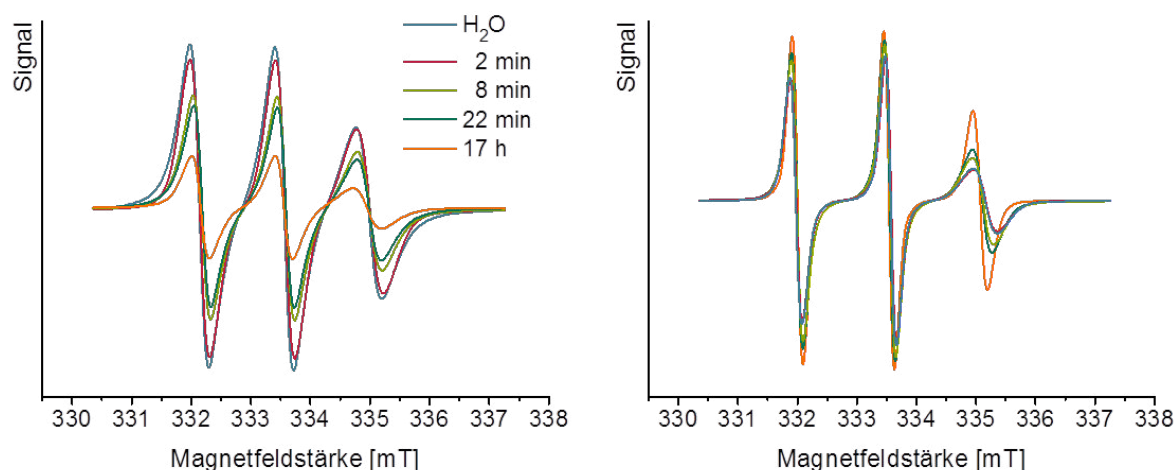


Abbildung 4.32: Entwicklung der Spektren der beiden Spezies über die Zeit für die ESR-Sonde C18-Tempo-Tempil-Stearat (inkorporiert in Cholesterylmyristat-Nanopartikel) nach dem Mischen der Cholesterylmyristat-Dispersion mit der Fettemulsion Lipofundin® (2:1). Links: Vermutliche Abnahme der Konzentration der ESR-Sonde in der Partikelmatrix der smektischen Lipidnanopartikel. Rechts: Wahrscheinliche Umverteilung der ESR-Sonde aus der Grenzfläche der smektischen Lipidnanopartikel in die Grenzfläche der Lipidphase von Lipofundin.

C18-Tempo-Tempil-Stearat in der Cholesterylmyristat-Matrix der smektischen Partikel und Spezies 2 den Anteil an der Oberfläche der Partikel dar.

Die Spektren zeigen eine deutliche Abnahme der Spezies 1, sowie eine Zunahme der Viskosität der Umgebung, zu erkennen an der breiter werdenden Hochfeldlinie (Abbildung 4.32 links). Für Spezies 2 konnte eine Zunahme der Konzentration und eine Abnahme der Viskosität der Umgebung (Hochfeldlinie wurde schmaler) detektiert werden (Abbildung 4.32 rechts). Betrachtet man die %-Anteile der jeweiligen Spezies zu den verschiedenen Zeitpunkten, wird eine deutliche Umverteilung der Sonde sichtbar (Abbildung 4.33).

Mit Hilfe der Hyperfeinkopplungskonstanten und der Rotationskorrelationszeit lässt sich erkennen, dass sich die Spezies 2 nach 17 Stunden in einer neuen Umgebung befindet (Tabelle 4.3). Die Sonde könnte in die Grenzfläche der Lipidphase von Lipofundin transferiert sein, da die neue Umgebung noch lipophil ist ($a_N = 1,54$ mT, vorher $a_N = 1,59$ mT), aber eine niedrigere Viskosität als die smektische Phase aufweist. Die Sonde ist außerdem viel beweglicher mit einer für Öle typischen Rotationskorrelationszeit von 0,31 ns (vorher 0,96 ns). Bei Spezies 1 ist es schwierig eine Aussage zu treffen. Aufgrund der breiteren ESR-Linien und der daraus resultierenden größeren Fehlerwerte für a_N und t_c , ist keine eindeutige Veränderung vorhanden. Da eine vollständige Umverteilung der Sonde nicht zu erwarten ist, stellt Spezies 1 sehr wahrscheinlich das restliche C18-Tempo-Tempil-Stearat in der Cholesterylmyristat-Matrix dar. Im Lipofundin® befinden sich neben den Emulsionsstropfen allerdings auch eine geringe Menge Liposomen, die als Akzeptor dienen könnten

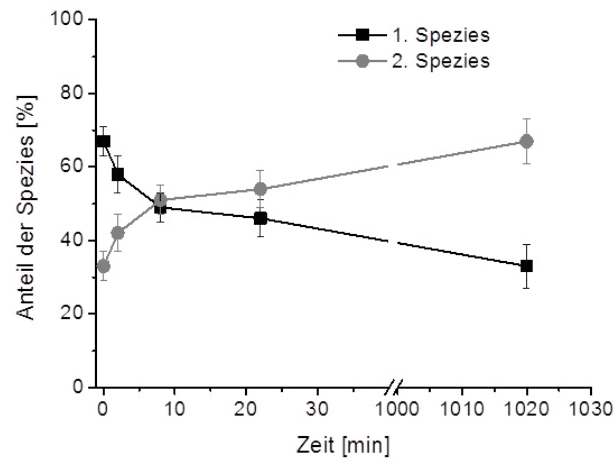


Abbildung 4.33: Anteil der zwei Spezies zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Transferuntersuchung.

[160]. Daher wäre eine andere Möglichkeit eine Umverteilung in die vorhandenen Liposomen, wobei allerdings die Umgebung ($a_N = 1,39$ mT) zu lipophil für Liposomen erscheint. Für die ESR-Sonde C16-Tempo-Tempil-Palmitat wurden in Liposomen z.B. von Kristl et al. Hyperfeinkopplungskonstanten im polaren Bereich ($a_N \geq 1,6$ mT) beobachtet [156].

Die Ergebnisse der ESR-Experimente zeigen, dass lipophile Fremdmoleküle, wie die ausgewählten ESR-Sonden bzw. deren Nitroxid-Gruppe, zum größten Teil in die Lipidphase der smektischen Nanopartikel inkorporiert werden. Allerdings ist hier zu beachten, dass die verwendeten Konzentrationen an ESR-Sonden sehr niedrig waren und daher keine Aussage zur Arzneistoff-Aufnahmekapazität gemacht werden kann und die Verteilung innerhalb der Partikel nicht unbedingt repräsentativ für die höher konzentrierten Arzneistoffe sein muss. Der Schutz der Sonde vor der wässrigen Phase hängt nicht nur von der Aufnahmekapazität und der Lokalisation in den Partikeln ab, sondern insbesondere von der Diffusion

Tabelle 4.3: ESR-Parameter aus den simulierten ESR-Spektren der Transferuntersuchung mit C18-Tempo-Tempil-Stearat.

Zeit	a_N [mT]	t_c [ns]
	Spezies 1 / Spezies 2	Spezies 1 / Spezies 2
0 min	$1,42 \pm 0,012$ / $1,59 \pm 0,003$	$0,76 \pm 0,08$ / $0,96 \pm 0,06$
2 min	$1,43 \pm 0,014$ / $1,59 \pm 0,003$	$0,65 \pm 0,08$ / $0,99 \pm 0,07$
8 min	$1,41 \pm 0,014$ / $1,56 \pm 0,003$	$0,72 \pm 0,11$ / $0,83 \pm 0,05$
22 min	$1,40 \pm 0,014$ / $1,56 \pm 0,002$	$0,79 \pm 0,14$ / $0,70 \pm 0,04$
17 h	$1,39 \pm 0,024$ / $1,54 \pm 0,002$	$1,10 \pm 0,29$ / $0,31 \pm 0,01$

der Sonde aus der Lipidmatrix in die Grenzfläche. Verglichen mit einer Emulsion war die Aufnahmekapazität für die Sonde 16-Doxylstearinsäure in die smektischen Partikel ähnlich gut, allerdings zeigten die smektischen Partikel trotz der hohen Viskosität der Lipidmatrix im Reduktionsassay einen geringeren Schutz der Sonde als die Emulsion. Inwieweit smektische Partikel daher in ihren Eigenschaften eher festen Lipidnanopartikeln ähneln, könnte durch weitere Untersuchungen wie z.B. einen Ascorbinsäure-Reduktionsassay mit festen Lipidnanopartikeln im Vergleich zu den smektischen Partikeln untersucht werden. Die Transferuntersuchung der Sonde C18-Tempo-Tempil-Stearat aus den smektischen Partikeln in ein lipophiles Akzeptormedium zeigte mit ungefähr 50%, einen relativ schnellen Transfer der Sonde innerhalb der ersten 22 Minuten (Abbildung 4.33).

ESR stellt eine hilfreiche Methode dar, um z.B. den Transfer von ESR-Sonden als Modell-Arzneistoffe aus kolloidalen Arzneistoff-Trägersystemen in andere Kompartimente zu untersuchen. Bisher gibt es hierzu allerdings erst wenige Studien. Rübe et al. konnten z.B. mittels ESR bei PLA-Nanokapseln die Diffusion der Sonde Tempolbenzoat aus der inneren Ölphase in die äußere Wasserphase untersuchen [161] oder die Verteilung von Tempolbenzoat zwischen Wasser, Öl und Mischmizellen während der *in vitro* Lipolyse von Olivenöl [162].

In Hinblick auf die Untersuchung der PEGylierung von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen, wäre ebenfalls der Einsatz von ESR-Messungen denkbar. Doxyl-Derivate von Phospholipiden könnten verwendet werden, um z.B. die PEGylierung nachzuweisen bzw. weitere Information über die Art und Weise der Inkorporierung zu erhalten. Da sich die Umgebung der Nitroxid-Sonde ändern sollte, wenn sich PEGylierte Phospholipide in der Nachbarschaft von Doxyl-Derivaten des Phosphatidylcholins befinden, müsste vermutlich auch ein Unterschied im ESR-Spektrum der PEGylierten Partikel verglichen mit dem ESR-Spektrum der nicht-PEGylierten Partikel sichtbar sein. Des Weiteren wäre es denkbar, eine nachträgliche PEGylierung mit Doxyl-Derivaten von MPEG₂₀₀₀-DSPE durchzuführen, um Informationen über die Verteilung des MPEG₂₀₀₀-DSPE in den Systemen zu erhalten. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre z.B. auch die Untersuchung der sterischen Abschirmung der Partikeloberfläche durch PEGylierung mittels ESR. Pantusa et al. konnten z.B. durch Einsatz von ESR zeigen, dass der Transfer von 5-Doxyl-Stearinsäure zwischen dem Protein Albumin und Phospholipid-Membranen reduziert wurde, wenn die Membranen PEGyliert waren [163].

Kapitel 5

Abschlussdiskussion

Unterkühlt-smektische Cholesterolester-Nanopartikel werden als ein potentielles kolloidales Lipidträgersystem für lipophile und schwer wasserlösliche Arzneistoffe untersucht. Ein möglicher Vorteil dieses aus physiologischen Substanzen bestehenden Trägersystems ist der flüssigkristalline Zustand der Lipidmatrix, durch den die Nachteile flüssiger Lipidemulsionen und fester Lipidnanopartikel überwunden werden sollen. In Hinblick auf eine intravenöse Applikation ist üblicherweise die Oberflächenmodifizierung der Partikel z.B. mittels Polyethylenglykol-Ketten notwendig, um eine ausreichend lange Zirkulationszeit im Blut zu erreichen [78]. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war daher, PEGylierte unterkühlt-smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel unter Verwendung von MPEG₂₀₀₀-DSPE herzustellen und die PEGylierung nachzuweisen.

Direkte PEGylierung Um zu beweisen, dass das verwendete MPEG₂₀₀₀-DSPE wirklich auf der Partikeloberfläche sitzt und sich nicht nur in der Wasserphase der Dispersionen befindet, war eine Überlegung, dass durch die Einlagerung des PEGylierten Phospholipids in die Partikeloberfläche Veränderungen der Partikeleigenschaften wie Partikelgröße, Zetapotential, Phasenverhalten und Rekristallisierungstendenz zu beobachten sein sollten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es in Abhängigkeit von der eingesetzten MPEG₂₀₀₀-DSPE-Konzentration bei der direkten PEGylierung zu deutlichen Veränderungen der Partikeleigenschaften kommt, wobei nicht nur die verringerte Partikelgröße, sondern vor allem auch die höhere Stabilität der PEGylierten Partikel gegenüber einer Rekristallisation während der Lagerung einen wichtigen Aspekt darstellen. Die verzögerte Rekristallisation unterstützt die Vermutung, dass die Polyethylenglykol-Gruppen einen Effekt auf das Kristallisationsverhalten haben, wie er auch beim Polysorbat 80 beobachtet wurde [7]. Allerdings ist eine detailliertere Untersuchung notwendig, um den Einfluss der PEG-Ketten getrennt von dem Effekt der Partikelgröße auf die Kristallisation zu

untersuchen. Theoretisch könnte hierzu die nachträgliche PEGylierung („*post-insertion*“ Methode) verwendet werden (siehe unten).

Eine weitere Idee, die Fragestellung über den Nachweis der PEGylierung zu beantworten, war es, die sterische Stabilisierung der Partikel, resultierend aus der PEGylierung, zu überprüfen. Die für diesen Zweck untersuchte Formulierung der PEGylierten Partikel bewies eine ausreichende sterische Stabilisierung sowohl in Calciumchlorid-Lösungen als auch bei unterschiedlichen pH-Werten, d.h. die PEGylierung trägt auch zur Verbesserung der Stabilität des kolloidalen Systems bei. Um die PEGylierung nicht nur auf indirektem Wege nachzuweisen, wurden als direkter Beweis die Polyethylenglykol-Ketten mittels ^1H -NMR auf den abzentrifugierten Partikeln detektiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PEGylierten Partikel beim Autoklavieren stabil bleiben und somit einen weiteren wichtigen Aspekt hinsichtlich der Anforderung auf Sterilität bei einer parenteralen Anwendung erfüllen.

Aufgrund dieser Ergebnisse der Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass PEGylierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel erfolgreich mittels der Hochdruck-Schmelzhomogenisation hergestellt werden können. Die hier verwendeten Methoden zum prinzipiellen Nachweis der PEGylierung sind relativ einfach in der Durchführung und könnten auch auf andere Systeme, wie z.B. feste Lipidnanopartikel übertragen werden. Eine Quantifizierung der PEGylierung ist dagegen schwieriger, da zuerst eine Trennung der Partikel von weiteren kleineren kolloidalen Strukturen und freiem MPEG₂₀₀₀-DSPE erfolgen muss. Erste Versuche in dieser Arbeit zur Abtrennung der Partikel mittels Ultrazentrifugation erwiesen sich in der durchgeführten Form als nicht quantitativ. Eine andere Möglichkeit ist die Trennung der Partikel mittels asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung. Mit dieser Methode konnten Kuntsche et al. erste Ergebnisse erzielen [145]. Des Weiteren ist eine Untersuchung der Wirksamkeit der PEGylierung in biologischen Systemen notwendig. Eine erfolgreiche PEGylierung führt zu einer Reduzierung der Plasmaproteinadsorption, die z.B. mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann [78]. Weitere Möglichkeiten sind der Nachweis einer reduzierten Phagocytose z.B. mit Hilfe eines in vitro-Tests an Maus-Macrophagen [90] oder der Nachweis einer verlängerten Zirkulationszeit durch Biodistributionsuntersuchungen [78]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mengen an MPEG₂₀₀₀-DSPE (2-8 mol%) sollten ausreichen, um eine verlängerte Zirkulationszeit der smektischen Partikel zu erzielen, da diese entsprechend dem Konzentrationsbereich, wie er für lang-zirkulierende Liposomen (3-7 mol%) bekannt ist, ausgewählt wurden [9]. Die Ergebnisse der ^1H -NMR-Messungen deuten außerdem darauf hin, dass die tatsächlich auf den Partikeln gefundene Konzentration an MPEG₂₀₀₀-DSPE nur geringfügig niedriger ist als die eingesetzte Konzentration bei der Herstellung der Dispersion.

Für die PEGylierung wurde in der vorliegenden Arbeit dem Homogenisationsschritt die Herstellung eines Phospholipidfilms vorangestellt, um eine exakte Abmessung und gute Verteilung der sehr geringen Mengen an eingesetztem MPEG₂₀₀₀-DSPE zu erreichen. Allerdings zeigte sich mittels ¹H-NMR, dass das hierfür verwendete Ethanol nicht vollständig mittels Vakuumrotationsverdampfung aus dem Phospholipidfilm entfernt werden konnte. Daher wäre für weiterführende Arbeiten ein Verzicht auf Ethanol zu empfehlen, indem versucht wird, das MPEG₂₀₀₀-DSPE direkt mitzuverarbeiten. Eine weitere Möglichkeit den Einsatz von Ethanol zu vermeiden, stellt die nachträgliche PEGylierung dar. Allerdings besteht bei der „*post-insertion*“ Methode noch Optimierungsbedarf (siehe unten).

Der Vorteil der Herstellung der unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel mittels Hochdruck-Schmelzhomogenisation ist ein einfaches *Scale-up*, demgegenüber steht allerdings ein hoher Energieaufwand aufgrund der recht aufwendigen Beheizung des Homogenisators, um die notwendigen hohen Temperaturen während der Herstellung zu erreichen und konstant zu halten. Durch die generelle Temperaturbelastung bei der Herstellung von smektischen Partikeln, sind diese als Trägersystem für hitzeempfindliche Wirkstoffe nur geeignet, wenn eine nachträgliche Beladung möglich ist. Kupetz et al. konnten eine erfolgreiche nachträgliche Beladung von smektischen Nanopartikeln mit KuRei300, einem Wirkstoff gegen Leishmaniose, zeigen [164].

Nachträgliche PEGylierung Im praktischen Versuch zeigten sich bei Anwendung der „*post-insertion*“ Methode sowohl bei 23 °C als auch bei 60 °C zwar Effekte auf Partikelgröße, Zetapotential und Phasenverhalten, die auf eine PEGylierung der Partikel hindeuten könnten, allerdings waren diese nicht eindeutig genug. Eine Überlagerung der Effekte durch eine PEGylierung von weiteren in der Probe vorkommenden kolloidalen Strukturen wie Liposomen wäre möglich. Um eine Überlagerung der Effekte zu vermeiden, müssten die PEGylierten Partikel separiert werden. Außerdem wäre eine Pufferung der Proben sinnvoll, um störende Effekte durch die Phospholipid-Hydrolyse zu vermeiden. Ein sichtbarer Unterschied zwischen der Inkubation bei 23 °C und 60 °C konnte an den Zetapotential-Werten beobachtet werden und deutet auf eine langsamer bzw. unvollständig ablaufende Einlagerung bei Raumtemperatur hin. Eventuell sind auch noch höhere Temperaturen notwendig, um eine bessere Einlagerung der PEGylierten Phospholipide in die Partikeloberflächen zu ermöglichen. Die Phasenübergangstemperatur des Lipoid S100 liegt bei ungefähr -20 °C [122] und die des DSPE in den MPEG₂₀₀₀-DSPE-Mizellen bei etwa 12 °C [144]. Die Phospholipid-Moleküle wechseln bei dieser Temperatur von der starren Gelphase in den flüssigkristallinen Zustand und sind daher beweglicher [109]. Die Inkubationstemperatur von 23 °C bzw. 60 °C liegt somit oberhalb der Phasenübergangstemperatur und sollte daher eigentlich ausreichen. Allerdings könnte ein weiterer

Faktor auch die sehr hohe Viskosität der smektischen Phase sein, die erst bei ca. 84 °C in den flüssigen Zustand übergeht. Daher könnte eine nachträgliche PEGylierung mit Inkubationstemperaturen über 85 °C erfolgreicher sein, wobei aber in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit einer Hydrolyse der Phospholipide gerechnet werden muss und aus diesem Grund gepufferte Proben eingesetzt werden sollten.

Ein Vorteil der nachträglichen PEGylierung ist die Herstellung auch von kleinen Mengen an PEGylierten Nanopartikeln. PEGylierte Phospholipide wie auch bestimmte Liganden, die zur Funktionalisierung von Nanopartikeln an die PEG-Ketten gekoppelt werden können wie z.B. Antikörper, sind sehr teuer bzw. nur in kleinen Mengen verfügbar oder zu instabil für bestimmte Herstellungsprozesse. Für diese Substanzen bietet die „*post-insertion*“ Methode den Vorteil, dass nur geringe Mengen benötigt werden, um eine breite Auswahl an funktionalisierten bzw. PEGylierten Nanopartikeln herzustellen. Anstelle einer separaten Herstellung kann eine einheitliche Ausgangscharge an Nanopartikeln aufgeteilt und durch die Einlagerung der gewünschten Liganden eine große Vielfalt an maßgefertigten Nanopartikeln hergestellt werden [130].

Oberflächenmodifizierung mit Poloxamer Aufgrund der hohen Kosten der PEGylierten Phospholipide ist es auch interessant zu untersuchen, inwieweit diese bei den smektischen Partikeln durch ähnlich wirkende, jedoch kostengünstigere Substanzen wie z.B. das Poloxamer 188, welches ebenfalls für die parenterale Anwendung zugelassen ist und zur Verlängerung der Zirkulationszeit eingesetzt wird [9], ersetzt werden können. Kuntsche et al. und Petersen et al. zeigten, dass smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel stabilisiert mit Poloxamer 188 hergestellt werden können [7, 59]. Die sterische Stabilisierung durch Poloxamer 188 wurde in dieser Arbeit überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur durch PEGylierung eine ausreichende sterische Stabilisierung erreicht wird, sondern auch durch Poloxamer 188. Eine Mischung aus S100 und Poloxamer 188 führte dagegen in der verwendeten Konzentration zu keiner sterischen Stabilisierung.

Positiv geladene Partikel Eine andere Art der Oberflächenmodifizierung ist die Herstellung von geladenen Partikeln in Hinblick auf die Beladung mit entgegengesetzt geladenen Wirkstoffen durch Adsorption, z.B. für Wirkstoffe wie Peptide oder Nukleinsäuren [13, 14]. In einem ersten Versuch konnten unterkühlt-smektische Cholesterylmyristat-Partikel mit einer positiv geladenen Oberfläche hergestellt werden. Um zu beurteilen, ob die Größe des Zetapotentials hinsichtlich Stabilität und Beladungseffizienz ausreichend ist, sind weitere Untersuchungen nötig.

Stabilität der Systeme Ein großer Vorteil der Lipidsysteme gegenüber z.B. Polymer-Nanopartikeln ist die gute Verträglichkeit aufgrund der verwendeten physiologischen Substanzen [118]. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die sehr verbreitet eingesetzten Phospholipide zu Problemen mit der chemischen Stabilität der Formulierungen führen können. In der Literatur findet man daher viele Studien zur chemischen Stabilität von Liposomen und Emulsionen [110, 111]. Bei Suspensionen (z.B. von festen Lipidnanopartikeln oder Arzneistoffkristallen), die häufig auch mit Phospholipiden stabilisiert werden, sind entsprechende Untersuchungen eher rar [115, 118]. Für die wässrigen Dispersionen der unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel konnten in der vorliegenden Arbeit wichtige Erkenntnisse zu deren chemischer Stabilität gewonnen werden. Für die nur mit Phospholipiden stabilisierten Dispersionen wurde eine massive Hydrolyse der Phospholipide während der Langzeit-Lagerung beobachtet. Die Zersetzung resultierte in deutlichen Veränderungen der physikalischen Eigenschaften wie pH, Zetapotential und Phasenverhalten der Dispersionen. Vor allem die Veränderungen des Phasenverhaltens müssen beachtet werden, da sie die Interpretation anderer Einflüsse (z.B. Art des Stabilisators oder inkorporierte Arzneistoffe) auf das Phasenverhalten erschweren. In diesem Fall erlauben nur Untersuchungen an frisch hergestellten Proben eine aussagekräftige Interpretation. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das gleiche Problem auch andere Arten von mit Phospholipiden stabilisierten kolloidalen Trägersystemen, z.B. feste Lipidnanopartikel, betrifft und möglicherweise auch deren physikalische Eigenschaften wie Kristallisationsverhalten oder polymorphe Umlagerungen beeinflusst. Um die Phospholipid-Hydrolyse zu reduzieren, kann der Einsatz von TRIS- oder Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) oder Substanzen wie Natriumglycocholat empfohlen werden. Für nur mit S100 stabilisierte Dispersionen wird beim Verwenden von Puffern ein zusätzlicher sterischer Stabilisator (z.B. MPEG₂₀₀₀-DSPE) benötigt. Da einige Puffer-Arten die Phospholipid-Hydrolyse beschleunigen können, sollte die geringst mögliche Pufferkonzentration ausgewählt werden, um den pH konstant zu halten [141]. Der Zusatz von EDTA und α -Tocopherol, welche hauptsächlich mit dem Ziel, die Oxidationsprozesse zu unterdrücken, verwendet wurden, reduzierte auch die Phospholipid-Hydrolyse zu einem gewissen Ausmaß. Der in dieser Studie verwendete Versuchsaufbau erlaubt keine Unterscheidung zwischen den Effekten auf die in der Grenzfläche der Partikel lokalisierten Phospholipid-Moleküle oder denen in den Liposomen, die sich in der Wasserphase der Dispersionen befinden. Deshalb ist weitere Arbeit erforderlich, um die Hypothese zu untersuchen, dass die Phospholipide in der Oberfläche der Partikel weniger anfällig für Zersetzung sind als diejenigen in den Liposomen [57]. Allerdings ist zu beachten, dass die von Kuntsche et al. betrachteten Systeme der smektischen Nanopartikel auch NaGC enthielten. Aufgrund der in dieser Arbeit festgestellten Pufferwirkung des NaGC sind daher die Ergebnisse möglicherweise neu zu betrachten.

Durch Separierung der Partikel von den Liposomen könnte die Phospholipid-Hydrolyse in der Partikeloberfläche getrennt von der in den Liposomen mittels HPTLC untersucht werden. Ein erster Versuch, die Partikel mittels Ultrazentrifugation von der Wasserphase inklusive Liposomen abzutrennen, erwies sich allerdings als unbefriedigend, da nur größere Partikel als Überstand abgetrennt werden konnten und die kleineren Cholesterylmyristat-Nanopartikel zusammen mit den weiteren kolloidalen Strukturen im Unterstand verblieben. Eine längere Ultrazentrifugationszeit führte zur Partikelaggregation (nachgewiesen durch PCS). Eine Separierung der Partikel wäre auch für die Partikelgrößenmessung mittels PCS wünschenswert, um ein Ergebnis zu erhalten, das nicht durch die anderen kolloidalen Strukturen beeinflusst ist. Außerdem könnte nach einer Auftrennung der kolloidalen Strukturen (Partikel, Vesikel, Mizellen) deren genaue Zusammensetzung an Phosphatidylcholin und MPEG₂₀₀₀-DSPE durch HPTLC-Untersuchungen bestimmt werden sowie die maximal mögliche Menge an MPEG₂₀₀₀-DSPE in der Oberfläche. Eine andere Methode, die zur Trennung der kolloidalen Strukturen untersucht wird, ist die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) [145]. Dieser Ansatz hat sich aber als sehr komplex erwiesen, so dass noch kein zuverlässiges Verfahren zur Verfügung steht.

Eine Hydrolyse des Cholesterolesters konnte während der Lagerung nicht beobachtet werden. Bei Cholesterolester-Dispersionen sollte allerdings Sauerstoff-Kontakt während der Lagerung vermieden werden (z.B. Verschließen der Vials unter Stickstoffatmosphäre oder Probennahme nur mit einer Spritze ohne Öffnen des Vials), um eine mögliche Oxidation des Cholesterolesters, wie sie teilweise beobachtet wurde, zu verhindern. Die Verwendung von Natriumglycocholat, EDTA oder α -Tocopherol kann die Dispersionen außerdem vor Oxidation schützen. Natriumglycocholat und EDTA sollten bevorzugt werden, da α -Tocopherol nur einen geringen Effekt zeigte und möglicherweise die Matriceigenschaften der Partikel beeinflussen könnte. Eine Lagerung bei 20-25 °C ist ratsam, da höhere Temperaturen die Hydrolyse der Phospholipide beschleunigen [141] und niedrigere Temperaturen die Kristallisation des Cholesterylmyristats fördern [56]. Eine Möglichkeit die Phospholipid-Hydrolyse zu umgehen, wäre die Entfernung der wässrigen Phase durch Gefriertrocknung [165]. Dieser Prozess hätte allerdings die Auskristallisation der smektischen Cholesterylmyristat-Partikel zur Folge. Daher wären Untersuchungen notwendig, inwieweit sich die Partikel durch ein anschließendes Redispergieren und Aufschmelzen wieder in einen stabilen smektischen Zustand überführen lassen würden. Alternativ könnte die Wasserphase auch durch Sprühtrocknung entfernt werden [166].

Physikalische Eigenschaften der Partikelmatrix und Wechselwirkungen mit ESR-Sonden als Modell-Arzneistoffe ¹H-NMR und ESR stellen vielversprechende Methoden zur Charakterisierung von kolloidalen Trägersystemen dar, z.B. hinsichtlich der

Eigenschaften der Lipidmatrix oder deren Wechselwirkung mit Arzneistoffen [128]. Eine interessante Frage ist, ob die unterkühlt-smektischen Nanopartikel in ihren Eigenschaften eher festen Lipidnanopartikeln ähneln oder Lipidemulsionen. Erste Hinweise auf eine größere Ähnlichkeit mit festen Lipidnanopartikeln ergeben sich aus den durchgeführten ^1H -NMR-Untersuchungen. Im flüssigen Zustand erhält man für Protonen scharfe Signale, wohingegen mit Einschränkung der Beweglichkeit aufgrund der kürzeren Relaxationszeit die Signale schwächer und breiter werden [133]. Bei den untersuchten Dispersionen konnten keine Cholesterylmyristat-Signale detektiert werden, so dass die Partikel anscheinend einen eher festen Charakter besitzen. Die ESR-Messungen bestätigen die sehr hohe Viskosität der Lipidmatrix. Die Ergebnisse des Ascorbinsäure-Reduktionsassays zeigen, dass die smektischen Partikel hinsichtlich des Schutzes der inkorporierten ESR-Sonde einer Lipidemulsion unterlegen sind. Einen neuen Ansatz hinsichtlich der Untersuchung der Wirkstoff-Freisetzung aus kolloidalen Systemen stellt eine in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Transferuntersuchung mit einer ESR-Sonde als Modell-Wirkstoff dar. Bei dieser ESR-Transferuntersuchung wurde eine relativ schnelle Freisetzung einer ESR-Sonde aus den smektischen Partikeln beobachtet. Möglicherweise bietet die hohe Viskosität der Lipidmatrix von smektischen Partikeln doch nicht die erhofften Vorteile einer langsameren Wirkstoff-Freisetzung im Vergleich zu Lipidemulsionen. Um diese Ergebnisse bewerten zu können, sind aber weitere vergleichende ESR-Messungen an festen Lipidnanopartikeln und Lipidemulsionen notwendig. Trotzdem können ESR-Transferuntersuchungen als eine einfache Möglichkeit empfohlen werden, um Hinweise auf das Freisetzungsverhalten von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen *in situ* zu erhalten. Ein Nachteil der ESR-Messungen ist, dass die meisten kolloidalen Arzneistoffträgersysteme keine paramagnetischen Moleküle enthalten und daher erst ESR-Sonden in die Systeme inkorporiert werden müssen. Die verwendeten Konzentrationen der ESR-Sonden sind sehr gering und daher nicht vergleichbar mit den üblicherweise eingesetzten Arzneistoffkonzentrationen in den kolloidalen Systemen.

Des Weiteren könnten ESR-Messungen auch eine Möglichkeit darstellen, um mit Hilfe von Doxyl-Derivaten von Phosphatidylcholin bzw. MPEG₂₀₀₀-DSPE die PEGylierung von Partikeln nachzuweisen und weitere Informationen über die Art und Weise der Inkorporierung von MPEG₂₀₀₀-DSPE-Molekülen zu erhalten.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von PEGylierten unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln zur parenteralen Anwendung und der Beweis der erfolgreichen PEGylierung durch den Nachweis der Veränderungen der Partikeleigenschaften aufgrund der Einlagerung der PEGylierten Phospholipide in die Oberflächenschicht der Partikel. Um eine PEGylierung zu erreichen, wurde MPEG₂₀₀₀-DSPE gemeinsam mit den während der Partikelherstellung als Emulgatoren verwendeten Phospholipiden verarbeitet. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass PEGylierte unterkühlt-smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel mittels Hochdruck-Schmelzhomogenisation hergestellt werden können. Der Einfluss des PEGylierten Phospholipids auf Partikelgröße, Zetapotential, Phasenverhalten und Rekristallisationstendenz der Nanopartikel deutet auf die Einlagerung des MPEG₂₀₀₀-DSPE in die Oberflächenschicht der Partikel hin. Die PEGylierung wurde außerdem durch ¹H-NMR-Messungen bestätigt und die sterische Stabilisierung wurde durch Neutralisierung der Partikeloberflächenladung mit Calciumchlorid oder durch Anpassung des pH-Wertes überprüft. Da Sterilität ein wichtiger Aspekt hinsichtlich einer parenteralen Applikation der Dispersionen ist, war die Stabilität der Partikel beim Autoklavieren ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Studie. Die Ergebnisse zeigen, dass die PEGylierten Partikel mittels Autoklavieren sterilisiert werden können. Insgesamt stellen die PEGylierten Partikel eine vielversprechende Formulierung im Hinblick auf eine kleine Partikelgröße, Stabilität gegenüber Rekristallisation und Autoklavierbarkeit dar.

Des Weiteren wurde die Frage untersucht, ob smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel mittels „*post-insertion*“ Methode nachträglich PEGyliert werden können. Die beobachteten Veränderungen der Partikelgröße, des Zetapotentials und des Phasenverhaltens deuten auf eine mögliche PEGylierung hin. Für einen eindeutigen Nachweis sind aber noch weitere Untersuchungen, sowie eine Optimierung des Inkubationsverfahrens notwendig.

Als eine günstigere Alternative zur PEGylierung mit dem relativ kostenintensiven MPEG₂₀₀₀-DSPE wurde Poloxamer 188 eingesetzt. Für die allein mit Poloxamer 188 stabilisierten Partikel konnte eine vergleichbare sterische Stabilisierung wie bei den mit S100 und MPEG₂₀₀₀-DSPE stabilisierten Partikeln nachgewiesen werden.

Neben der PEGylierung der Partikeloberfläche stellt außerdem die Modifizierung der Oberflächenladung der Partikel einen weiteren interessanten Aspekt in Hinblick auf die Beladung mit entgegengesetzt geladenen Wirkstoffen dar. Erste Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die erfolgreiche Herstellung von positiv geladenen unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln durch den Einsatz des kationischen Lipids DDAB.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung der chemischen Stabilität der mit Phospholipiden oder einer Mischung aus Phospholipid und Natriumglycocholat stabilisierten PEGylierten bzw. nicht-PEGylierten Cholesterylmyristat-Nanopartikel. Da diese Systeme auf einem Cholesterolester basieren und mit Phospholipiden stabilisiert sind, die jeweils anfällig für Oxidation und Hydrolyse sind, wurde ihre Stabilität direkt nach der Herstellung und während der Lagerung untersucht. Trotz der hohen Temperaturen während des Aufschmelzens und der Hochdruckhomogenisation wurde keine Hydrolyse in den Dispersionen direkt nach der Herstellung detektiert. Während der Lagerung von 5-8 Monaten zeigten die nur mit Phospholipid stabilisierten Dispersionen eine massive Hydrolyse der Phospholipide bei der HPTLC-Untersuchung. Die Phospholipid-Hydrolyse resultierte in deutlichen Veränderungen der physikalischen Eigenschaften wie pH, Zetapotential und Phasenverhalten der Dispersionen. Bei den Systemen, die zusätzlich Natriumglycocholat als Stabilisator enthielten, trat die hydrolytische Zersetzung nur in einem geringen Ausmaß auf. Die Hydrolyse der Phospholipide konnte außerdem durch das Hinzufügen von TRIS- oder Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) zu der wässrigen Phase vor dem Herstellungsprozess reduziert werden. Der Zusatz von EDTA und α -Tocopherol, der im Wesentlichen dazu verwendet wurde, um die möglichen Oxidationsvorgänge zu unterdrücken, reduzierte in einem gewissen Maß ebenfalls die Phospholipid-Hydrolyse. Eine teilweise Oxidation des Cholesterylmyristats wurde in einigen Dispersionen mittels HPTLC, HPLC und Massenspektrometrie nach Langzeit-Lagerung beobachtet, konnte aber durch Zugabe von EDTA oder α -Tocopherol reduziert werden.

Mit Hilfe von ¹H-NMR- und ESR-Untersuchungen konnten wichtige Informationen über den Matrix-Charakter der unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel gewonnen werden. Die durchgeführten Untersuchungen wiesen auf einen eher festen Charakter der smektischen Partikel hin, so dass die smektischen Partikel möglicherweise in ihren Eigenschaften eher festen Lipidnanopartikeln als Nanoemulsionen ähneln. Hinsichtlich des Schutzes einer inkorporierten ESR-Sonde boten die smektischen Partikel keinen Vorteil

gegenüber einer Lipidnanoemulsion. Des Weiteren zeigten die smektischen Partikel eine relativ schnelle Freisetzung einer ESR-Sonde bei einer Transferuntersuchung.

Literaturverzeichnis

- [1] Kuntsche, J.; Westesen, K.; Drechsler, M.; Koch, M.H.J.; Bunjes, H.: Supercooled smectic nanoparticles: a potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. In: Pharm. Res. 21 (2004) 1834-1843
- [2] Westesen, K.; Bunjes, H.; Koch, M.H.J.: Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. In: J. Control. Rel. 48 (1997) 223-236
- [3] Mehnert, W.; Mäder, K.: Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. In: Adv. Drug Delivery Rev. 47 (2001) 165-196
- [4] Westesen, K.: Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems - expectations and reality. In: Colloid Polym. Sci. 278 (2000) 608-618
- [5] Klang, S.; Benita, S.: Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: Benita, S. (Hrsg.); Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery: Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1998, 119-152
- [6] Washington, C.; Evans, K.: Release rate measurements of model hydrophobic solutes from submicron triglyceride emulsions. In: J. Control. Rel. 33 (1995) 383-390
- [7] Kuntsche, J.; Koch, M.H.J.; Steiniger, H.; Bunjes, H.: Influence of stabilizer system on the properties and phase behavior of supercooled smectic nanoparticles. In: J. Colloid Interface Sci. 350 (2010) 229-239
- [8] Moghimi, S.M.; Patel, G.M.: Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - the concept of tissue specificity. In: Adv. Drug Delivery Rev. 32 (1998) 45-60
- [9] Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. In: Pharmacol. Rev. 53 (2001) 283-319

- [10] G. Barrat: Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2003) 21-37
- [11] Wheeler, J.J.; Wong, K.F.; Ansell, S.M.; Masin, D.; Bally, M.B.: Polyethylene glycol modified phospholipids stabilized emulsions prepared from triacylglycerol. In: *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 1558-1564
- [12] Allen, T.M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A.: Liposomes containing synthetic lipid derivates of poly(ethylene-glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1066 (1991) 29-36
- [13] Olbrich, C.; Bakowsky, U.; Lehr, C.-M.; Müller, R.H.; Kneuer, C.: Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. In: *J. Control. Rel.* 77 (2001) 345-355
- [14] Garcia-Fuentes, M.; Torres, D.; Alonso, M.J.: New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. In: *Int. J. Pharm.* 296 (2005) 122-132
- [15] Bunjes, H.: Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 1637-1645
- [16] Constantinides, P.P.; Chaubal M.V.; Shorr, R.: Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 60 (2008) 757-767
- [17] Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E.: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. In: *J. Control. Rel.* 70 (2001) 1-20
- [18] Schubert, R.: Liposomen. In: Mäder, K.; Weidenauer, U. (Hrsg.); *Innovative Arzneiformen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, 2010, 149-163
- [19] Sharma, A.; Sharma, U.S.: Liposomes in drug delivery: progress and limitations. In: *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 123-140
- [20] Rote Liste 2011: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt am Main, 2011
- [21] Pranker, R.J.; Stella, V.J.: The use of oil-in-water emulsions as vehicle for parenteral drug administration. In: *J. Parent. Sci. Technol.* 44 (1990) 139-149
- [22] Collins-Gold, L.C.; Lyons, R.T.; Bartholow, L.C.: Parenteral emulsions for drug delivery. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 5 (1990) 189-208

- [23] Klang, V.; Valenta, C.: Lecithin-based nanoemulsions. In: *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21 (2011) 55-76
- [24] Constantinides, P.P.; Tustian, A.; Kessler, D.R.: Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 56 (2004) 1243-1255
- [25] Washington, C.: Stability of lipid emulsions for drug delivery. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 20 (1996) 131-145
- [26] Magenheim, B.; Levy, M.Y.; Benita, S.: A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. In: *Int. J. Pharm.* 94 (1993) 115-123
- [27] Gasco, M.R.; Morel, S.: Lipospheres from microemulsions. In: *Farmaco* 45 (1990) 1127-1128
- [28] Trotta, M.; Debernardi, F.; Caputo, O.: Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. In: *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 153-160
- [29] Siekmann, B.; Westesen, K.: Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 (1996) 104-109
- [30] Bunjes, H.; Westesen, K.; Koch, H.H.J.: Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. In: *Int. J. Pharm.* 129 (1996) 159-173
- [31] Westesen, K.; Siekmann, B.: Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. In: *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 35-45
- [32] Bunjes, H.; Siekmann, B.; Westesen, K.: Emulsions of supercooled melts - a novel drug delivery system. In: Benita, S. (Hrsg.); *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*: Harwood Academic Publisher, Amsterdam, 1998, 175-204
- [33] Müller, R.H.; Radtke, M.; Wissing, S.A.: Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. In: *Int. J. Pharm.* 242 (2002) 121-128
- [34] Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M.J.; Torres, D.: Design and characterization of a new drug nanocarrier made from solid-liquid lipid mixtures. In: *J. Colloid Interface Sci.* 285 (2005) 590-598
- [35] Esposito, E.; Fantin, M.; Marti, M.; Drechsler, M.; Paccamiccio, L.; Mariani, P., et al.: Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. In: *Pharm. Res.* 25 (2008) 1521-1530

- [36] Jores, K.; Mehnert, W.; Mäder, K.: Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. In: *Pharm. Res.* 20 (2003) 1274-1283
- [37] Jores, K.; Mehnert, W.; Drechsler, M.; Bunjes, H.; Johann, Christoph, J.; Mäder, K.: Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. In: *J. Control. Rel.* 95 (2004) 217-227
- [38] Bunjes, H.; Kuntsche, J.: Lipid nanoparticles based on liquid crystalline phases. In: Amiji, M.M.; Torchilin, V.P. (Hrsg.); *Handbook of Materials for Nanomedicine*: Pan Stanford, Singapore, 2011, 445-493
- [39] Lehmann, O.: Über fließende Krystalle. In: *Z. Phys. Chem.* 4 (1889) 462-472
- [40] Reinitzer, F.: Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins. In: *Monatsh. Chem.* 9 (1888) 412-441
- [41] Müller-Goymann, C.C.: Liquid crystals in drug delivery, In: Swarbrick, J.; Boylan, J.C. (Hrsg.); *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*: Marcel Dekker Inc., New York, 2001, 117-146
- [42] Malmsten, M.: Liquid crystalline phases. In: Malmsten, M. (Hrsg.); *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*: Marcel Dekker, New York, 2002, 51-86
- [43] Drummond, C.J.; Fong, C.: Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4 (2000) 449-456
- [44] Barauskas, J.; Johnsson, M.; Tiberg, F.: Self-assembled lipid superstructures: beyond vesicles and liposomes. In: *Nano Lett.* 5 (2005) 1615-1619
- [45] Kaasgaard, T.; Drummond, C.J.: Ordered 2-D and 3-D nanostructured amphiphile self-assembly materials stable in excess solvent. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 4957-4975
- [46] Spicer, P.T.: Progress in liquid crystalline dispersions: cubosomes. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 274-279
- [47] Gustafsson, J.; Ljusberg-Wahren, H.; Almgren, M.; Larsson, K.: Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer. In: *Langmuir* 13 (1997) 6964-6971

- [48] Boyd, B.J.: Characterisation of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method. In: *Int. J. Pharm.* 260 (2003) 239-247
- [49] Leesajakul, W.; Nakano, M.; Taniguchi, A.; Handa, T.: Interaction of cubosomes with plasma components resulting in the destabilization of cubosomes in plasma. In: *Colloids Surface B* 34 (2004) 253-258
- [50] Siekmann, B.; Bunjes, H.; Koch, M.H.J.; Westesen, K.: Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride-water phases. In: *Int. J. Pharm.* 244 (2002) 33-43
- [51] Fisch, M.R.; Kumar, S.: Introduction to liquid crystals. In: Kumar, S. (Hrsg.); *Liquid Crystals*: Cambridge University Press, 2001, 1-27
- [52] Madhusudana, N.V.: Recent advances in thermotropic liquid crystals. In: *Curr. Sci.* 80 (2001) 1018-1025
- [53] Bunjes, H.; Rades, T.: Thermotropic liquid crystalline drugs. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 807-816
- [54] Ginsburg, G.S.; Atkinson, D.; Small, D.M.: Physical properties of cholesteryl esters. In: *Prog. Lipid Res.* 23 (1984) 135-167
- [55] Bunjes, H.; Kuntsche, J.: Supercooled smectic nanoparticles. In: Thassu, D.; Deleers, M.; Pathak, Y. (Hrsg.); *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*: Informa Health Care, New York, 2007, 129-140
- [56] Kuntsche, J.; Koch, M.H.J.; Drechsler, M.; Bunjes, H.: Crystallization behavior of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles containing phospholipids as stabilizers. In: *Colloids Surf. B* 44 (2005) 25-35
- [57] Kuntsche, J.; Bunjes, H.: Influence of preparation conditions and heat treatment on the properties of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 612-620
- [58] Kuntsche, J.; Koch, M.H.J.; Fahr, A.; Bunjes, H.: Supercooled smectic nanoparticles: influence of the matrix composition and in vitro cytotoxicity. In: *Eur. J. Pharm. Sci.* 38 (2009) 238-248
- [59] Petersen, S.; Steiniger, F.; Fischer, D.; Fahr, A.; Bunjes, H.: The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 150-161

- [60] Hevonoja, T.; Pentikäinen, M.O.; Hyvönen, M.T.; Kovanen, P.T.; Ala-Korpela, M.: Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 189-210
- [61] Firestone, R.A.: Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. In: *Bioconjugate Chem.* 5 (1994) 105-113
- [62] Deckelbaum, R.J.; Shipley, G.G.; Small, D.M.: Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. In: *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 744-754
- [63] Rensen, P.C.N.; de Vreeh, R.L.A.; Kuiper, J.; Bijsterbosch, M.K.; Biessen, E.A.L., van Berkel, T.J.C.: Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 47 (2001) 251-276
- [64] Maranhão, R.C.; Garicochea, B.; Silva, E.L.; Dorlhiac-Llacer, P.; Cadena, S.M.S.; Coelho, I.J.C.; Meneghetti, J.C.; Pileggi, F.J.C.; Chamone, D.A.F.: Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. In: *Cancer Res.* 54 (1994) 4660-4666
- [65] Ginsburg, G.S.; Small, D.M.; Atkinson, D.: Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8216-8227
- [66] Pregetter, M.; Prassl, R.; Schuster, B.; Kriechbaum, M.; Nigon, F.; Chapman, J.; Laggner, P.: Microphase separation in low density lipoproteins. Evidence for a fluid triglyceride core below the lipid melting transition. In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1334-1341
- [67] van Antwerpen, R.; Gilkey, J.C.: Cryo-electron microscopy reveals human low density lipoprotein substructure. In: *J. Lipid Res.* 35 (1994) 2223-2231
- [68] Gerke, A.; Westesen, K.; Koch, M.H.J.: Physicochemical characterization of protein-free low density lipoprotein models and influence of drug loading. In: *Pharm. Res.* 13 (1996) 44-51
- [69] Torchilin, V.P.: Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. In: Schäfer-Korting, M. (Hrsg.); *Drug delivery, Handb. of Exp. Pharmacol.* 197: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, 3-52
- [70] Maeda, H.: The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. In: *Adv. Enzyme Regul.* 41 (2001) 189-207

- [71] Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L.K.; Farokhzad, O.C.: Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. In: *Mol. Pharmaceutics* 5 (2008) 505-515
- [72] Torchilin, V.P.; Trubetskoy, V.S.: Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 16 (1995) 141-155
- [73] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S.: Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. In: *Angew. Chem.* 49 (2010) 6288-6308
- [74] Allen, T.M.: The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 13 (1994) 285-309
- [75] Blume, G.; Cevc, G.: Liposomes for the sustained drug release in vivo. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1029 (1990) 91-97
- [76] Klibanov, A.L.; Maruyama, K.; Torchilin, V.P.; Huang, L.: Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. In: *FEBS Lett.* 268 (1990) 235-237
- [77] Woodle, M.C.; Lasic, D.D.: Sterically stabilized liposomes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1113 (1992) 171-199
- [78] Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R.H.; Verbavatz, J.M.; Langer, R.: The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 16 (1995) 215-233
- [79] Bocca, C.; Caputo, O.; Cavalli, R.; Gabriel, L.; Miglietta, A.; Gasco, M.R.: Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. In: *Int. J. Pharm.* 175 (1998) 185-193
- [80] Liu, F.; Liu, D.: Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. In: *Pharm. Res.* 12 (1995) 1060-1064
- [81] Rossi, J.; Giasson, S.; Khalid, M.N.; Delmas, P.; Allen, C.; Leroux, J.-C.: Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated emulsions to target solid tumors. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 329-338
- [82] Dams, E.T.M.; Laverman, P.; Oyen, W.J.G.; Storm, G.; Scherphof, G.L.; van der Meer, J.W.M.; Corstens, F.H.M.; Boerman, O.C.: Accelerated blood clearance and

- altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 (2000) 1071-1079
- [83] Ishida, T.; Maeda, R.; Ichihara, M.; Irimura, K.; Kiwada, H.: Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. In: *J. Control. Rel.* 88 (2003) 35-42
- [84] Ishida, T.; Kiwada, H.: Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. In: *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 56-62
- [85] Szebeni, J.; Muggia, F.; Gabizon, A.; Barenholz, Y.: Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 63 (2011) 1020-1030
- [86] Ishida, T.; Harada, M.; Wang, X.Y.; Ichihara, M.; Irimura, K.; Kiwada, H.: Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. In: *J. Control. Rel.* 105 (2005) 305-317
- [87] Zillies, J.C.; Zwioerek, K.; Winter, G.; Coester, C.: Method for quantifying the PEGylation of gelatin nanoparticle drug carrier systems using asymmetrical flow field-flow fractionation and refractive index detection. In: *Anal. Chem.* 79 (2007) 4574-4580
- [88] Cheng, T.-L.; Chuang, K.-H.; Chen, B.-M.; Roffler, S.R.: Analytical measurement of PEGylated molecules. In: *Bioconjugate Chem.* 23 (2012) 881-899
- [89] Blunk, T.; Hochstrasser, D.F.; Sanchez, J.C.; Müller, B.W.; Müller, R.H.: Colloidal carriers for intravenous drug targeting - determination of plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Electrophoresis* 14 (1993) 1382-1387
- [90] Sheng, Y.; Yuan, Y.; Liu, C.; Tao, X.; Shan, X.; Xu, F.: In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effects of PEG content. In: *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 20 (2009) 1881-1891
- [91] Harms, M.; Müller-Goymann, C.C.: Solid lipid nanoparticles for drug delivery. In: *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21 (2011) 89-99
- [92] Torchilin, V.P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. In: *Nat. Rev. Drug Discovery* 4 (2005) 145-160

- [93] Couvreur, P.; Vauthier, C.: Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. In: *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450
- [94] Goren, D.; Horowitz, A.T.; Tzemach, D.; Tarshish, M.; Zalipsky, S.; Gabizon, A.: Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. In: *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1949-1957
- [95] Oyewumi, M.O.; Yokel, R.A.; Jay, M.; Coakley, T.; Mumper, R.J.: Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. In: *J. Control. Rel.* 95 (2004) 613-626
- [96] Michaelis, K.; Hoffmann, M.M.; Dreis, S.; Herbert, E.; Alyautdin, R.N.; Michaelis, M.; Kreuter, J.; Langer, K.: Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 1246-1253
- [97] Kreuter, J.: Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 47 (2001) 65-81
- [98] Barbu, E.; Maolnar, E.; Tsibouklis, J.; Gorecki, D.C.: The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. In: *Exp. Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 553-565
- [99] Gabizon, A.; Papahadjopoulos, D.: The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 1103 (1992) 94-100
- [100] Mintzer, M.A.; Simanek, E.E.: Nonviral vectors for gene delivery. In: *Chem. Rev.* 109 (2009) 259-302
- [101] Morille, M.; Passirani, C.; Vonarbourg, A.; Clavreul, A.; Benoit, J.-P.: Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. In: *Biomaterials* 29 (2008) 3477-3496
- [102] Lasic, D.D.: Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. In: *J. Control. Rel.* 48 (1997) 203-222
- [103] Tabatt, K.; Sameti, M.; Olbrich, C.; Müller, R.H.; Lehr, C.-M.: Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 155-162

- [104] Peek, L.J.; Middaugh, C.R.; Berkland, C.: Nanotechnology in vaccine delivery. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 60 (2008) 915-928
- [105] Loney, C.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.M.: Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. In: *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 340-347
- [106] Yang, S.C.; Benita, S.: Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. In: *Drug Dev. Res.* 50 (2000) 476-486
- [107] Lyons, R.T.; Carter, E.G.: Lipid emulsions for intravenous nutrition and drug delivery. In: Gunstone, F.D.; Padley, F.B. (Hrsg.); *Lipid Technologies and Applications*: Marcel Dekker, New York, 1997, 535-556
- [108] Férézou, J.; Lai, N.-T.; Leray, C.; Hajri, T.; Frey, A.; Cabaret, Y.; Courtieu, J.; Lutton, C.; Bach, A.C.: Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 1213 (1994) 149-158
- [109] van Hoogevest, P.; Liu, X.; Fahr, A.; Leigh, M.L.S.: Role of phospholipids in the oral and parenteral delivery of poorly water soluble drugs. In: *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21 (2011) 5-16
- [110] Washington, C.; Davis, S.S.: Ageing effects in parenteral fat emulsions: the role of fatty acids. In: *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 33-37
- [111] Grit, M.; Crommelin, D.J.A.: Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. In: *Chem. Phy. Lipids* 64 (1993) 3-18
- [112] Weltzien, H.V.: Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. In: *Biochim. Biophys. Acta* 559 (1979) 259-287
- [113] Zuidam, N.J.; Gouw, H.K.M.E.; Barenholz, Y.; Crommelin, D.J.A.: Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1240 (1995) 101-110
- [114] Herman, C.J.; Groves, M.J.: Hydrolysis kinetics of phospholipids in thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 539-542
- [115] Werling, J.; Graham, S.; Owen, H.; Nair, L.; Gonyon, T.; Carter, P.W.: Physicochemical stability of phospholipid-dispersed suspensions of crystalline itraconazole. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1104-1113

- [116] Müller, R.H.; Peters, K.: Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by size-reduction technique. In: *Int. J. Pharm.* 160 (1998) 229-237
- [117] Young, T.J.; Johnston, K.P.; Gary, W.P.; Mishra, A.K.: Phospholipid-stabilized nanoparticles of cyclosporine A by rapid expansion from supercritical to aqueous solution. In: *AAPS PharmSciTech* 5 (2003) 70-85
- [118] Müller, R.H.; Mäder, K.; Gohla, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161-177
- [119] Small, D.M.: The physical chemistry of lipids - from alkanes to phospholipids. In: Hanahan, D.J. (Hrsg.); *Handbook of Lipid Research 4*: Plenum Press, New York, 1986
- [120] Paltauf, F.; Hermetter, A.: Phospholipids - natural, semisynthetic, synthetic. In: Hanin I., Pepeu, G. (Hrsg.); *Phospholipids: Biochemical, Pharmaceutical and Analytical Considerations*: Plenum Press, New York 1990, 1-12
- [121] Carpentier, Y.A., Dupont, I.E.: Advances in intravenous lipid emulsions. In: *World J. Surg.* 24 (2000) 14933-1497
- [122] Produktinformation, Lipoid GmbH, 2009-2011
- [123] Lappalainen, K.; Urtti, A.; Söderling, E.; Jääskeläinen, I.; Syrjänen, K.; Syrjänen, S.: Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1196 (1994) 201-208
- [124] Fachinformation Lipofundin® MCT, Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt am Main, 2007
- [125] Schultz, S.; Wagner, G.; Ulrich, J.: Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung. In: *Chem. Ing. Tech.* 74 (2002) 901-909
- [126] Carroll, R.M.; Rudel, L.L.: Evaluation of a high-performance liquid chromatography method for isolation and quantification of cholesterol and cholesteryl esters. In: *J. Lipid Res.* 22 (1981) 359-363
- [127] Yao, J.K.; Rastetter, G.M.: Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. In: *Anal. Biochem.* 150 (1985) 111-116

- [128] Lurie, D.J.; Mäder, K.: Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques - principles and application. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 1171-1190
- [129] Bunjes, H.; Koch, M.H.J.: Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. In: *J. Control. Rel.* 107 (2005) 229-243
- [130] Uster, P.S.; Allen, T.M.; Daniel, B.E.; Mendez, C.J.; Newman, M.S.; Zhu, G.Z.: Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. In: *FEBS Lett.* 386 (1996) 243-246
- [131] Hoarau, D.; Delmas, P.; David, S.; Roux, E.; Leroux, J.-C.: Novel long-circulating lipid nanocapsules. In: *Pharm. Res.* 21 (2004) 1783-1789
- [132] Jumaa, M.; Müller, B.W.: The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant. In: *Int. J. Pharm.* 174 (1998) 29-37
- [133] Schubert, M.A.; Harms, M.; Müller-Goymann, C.C.: Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. In: *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 226-236
- [134] Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W.: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. In: Boschke, F.L.; Fresenius, W.; Huber, J.F.K.; Pungor, E.; Simon, W.; West, Th.S. (Hrsg.); *Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis*. Bd. 15: Springer-Verlag, Berlin, 1986
- [135] Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; Nieto, S.: Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. In: *Biol. Res.* 36 (2003) 291-302
- [136] Bergstrand, N.; Edwards, K.: Aggregate structure in dilute aqueous dispersions of phospholipids, fatty acids, and lyso-phospholipids. In: *Langmuir* 17 (2001) 3245-3253
- [137] Cistola, D.P.; Hamilton, J.A.; Jackson, D.; Small, D.M.: Ionization and phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. In: *Biochemistry* 27 (1988) 1881-1888
- [138] Langner, M.; Isac, T.; Hui, S.W.: Interaction of free fatty acids with phospholipid bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1236 (1995) 73-80

- [139] Small, D.M.; Cabral, D.J.; Cistola, D.P.; Parks, J.S.; Hamilton, J.A.: The ionization behavior of fatty acids and bile acids in micelles and membranes. In: *Hepatology* 4 (1984) 77-79
- [140] Perez De La Cruz Moreno, M.; Oth, M.; Deferme, S.; Lammert, F.; Tack, J.; Dressman, J.; Augustijns, P.: Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 1079-1089
- [141] Grit, M.; Underberg, W.J.M.; Crommelin, D.J.A.: Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 362-366
- [142] Reis, A.; Spickett, C.M.: Chemistry of phospholipid oxidation. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2374-2387
- [143] Ishida, T.; Iden, D.L.; Allen, T.M.: A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs. In: *FEBS Lett.* 460 (1999) 129-133
- [144] Kastantin, M.; Ananthanarayanan, B.; Karmali, P.; Ruoslahti, E.; Tirrell, M.: Effect of lipid chain melting transition on the stability of DSPE-PEG (2000) micelles. In: *Langmuir* 25 (2009) 7279-7286
- [145] Kuntsche, J.; Sanger, S.; Mengersen, F., Bunjes, H.: Analysis of supercooled smectic nanoparticles by asymmetrical flow field-flow fractionation. Poster presented at the Annual Meeting of the DPhG, Braunschweig, 2010
- [146] Kenworthy, A.K.; Hristova, K.; Needham, D.; McIntosh, T.J.: Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). In: *Biophys. J.* 68 (1995) 1921-1936
- [147] Bartucci, R.; Pantusa, M.; Marsh, D.; Sportelli, L.: Interaction of human serum albumin with membranes containing polymer-grafted lipids: spin-label ESR studies in the mushroom and brush regimes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 237-242
- [148] Lasic, D.D.: Sterically Stabilized Vesicles. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 (1994) 1685-1698
- [149] Johnsson, M.; Edwards, K.: Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregates structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. In: *Biophys. J.* 85 (2003) 3839-3847

- [150] Zimmermann, R.; Freudenberg, U.; Schweiß, R.; Küttner, D.; Werner, C.: Hydroxide and hydronium ion adsorption - a survey. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 196-202
- [151] Müller, R.H.; Maassen, S.; Schwarz, C.; Mehnert, W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. In: *J. Control. Rel.* 47 (1997) 261-269
- [152] Freitas, C.; Mueller, R.H.: Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticles (SLNTM) dispersions. In: *Int. J. Pharm.* 168 (1998) 221-229
- [153] Kempe, S.; Metz, H.; Mäder, K: Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - chances and challenges. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 55-66
- [154] Ahlin, P.; Kristl, J.; Pečar, S.; Štrancar, J; Šentjerc, M.: The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. In: *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 58-66
- [155] Marsh, D.: Electron spin resonance: spin labels. In: *Membrane Spectroscopy*; Grell, E. (Hrsg.): Springer, Heidelberg, 1981, 52-137
- [156] Kristl, J.; Volk, B.; Gašperlin, M.; Šentjerc, M.; Jurkovič, P.: Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. In: *Eur. J. Pharm. Sci.* 19 (2003) 181-189
- [157] Sicherheitsdatenblatt Miglyol 812 N, Sasol Germany GmbH, 2007
- [158] Berton-Carabin, C.C.; Coupland, J.N.; Elias, R.J.: Effect of lipophilicity of model ingredients on their location and reactivity in emulsions and solid lipid nanoparticles. In: *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 431 (2013) 9-17
- [159] Ahlin, P.; Kristl, J.; Šentjerc, M.; Štrancar, J.; Pečar, S.: Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions. In: *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 241-244
- [160] Kuntsche, J.; Horst, J.C.; Bunjes, H.: Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. In: *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 120-137
- [161] Rube, A.; Mäder, K.: An electron spin resonance study on the dynamics of polymeric nanocapsules. In: *J. Biomed. Nanotechnol.* 1 (2005) 208-213

-
- [162] Rube, A.; Klein, S.; Mäder, K.: Monitoring of in vitro fat digestion by electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: Pharm. Res. 23 (2006) 2024-2029
- [163] Pantusa, M.; Sportelli, L.; Bartucci, R.: Transfer of steric acid from albumin to polymer-grafted lipid containing membranes probed by spin-label electron spin resonance. In: Biophys. Chem. 114 (2005) 121-127
- [164] Kupetz, E.; Preu, L.; Kunick, C.; Bunjes, H.: Parenteral formulation of an antileishmanial drug candidate - tackling poor solubility, chemical instability, and polymorphism. In: Eur. J. Pharm. Biopharm. 85 (2013) 511-520
- [165] Chen, C.; Han, D.; Cai, C.; Tang, X.: An overview of liposome lyophilization and its future potential. In: J. Control. Rel. 142 (2010) 299-311
- [166] Freitas, C.; Mueller, R.H.: Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). In: Eur. J. Pharm. Biopharm. 46 (1998) 145-151

Anhang

A1 Phasenverhalten der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen CM-Dispersionen nach Lagerung

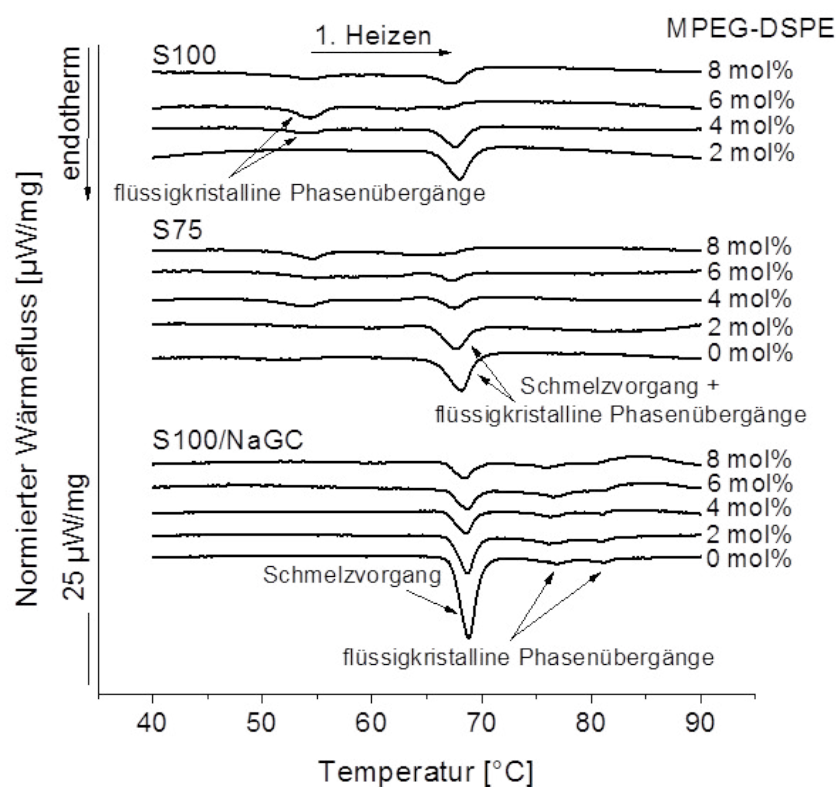


Abbildung A.1: DSC-Heizkurven der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen CM-Dispersionen nach 6 Monaten Lagerung. Für eine Beschreibung des generellen Phasenverhaltens und der Veränderungen des Phasenverhaltens während der Lagerung siehe Abschnitt 2.2.3.1 bzw. 4.2.4. Die nur mit S100 stabilisierte Probe zeigte Phasentrennung nach der Lagerung von 6 Monaten und ist daher nicht dargestellt.

Der endotherme Phasenübergang bei etwa 68 °C in Abbildung A.1 stellt den Schmelzvorgang von rekristallisiertem Cholesterylmyristat dar. Eine Auswertung der exakten Menge an rekristallisiertem Cholesterylmyristat nach 6 Monaten Lagerung ist in den Proben, die massive Phospholipid-Hydrolyse aufweisen, nicht möglich, da sich die flüssigkristallinen Übergänge zu niedrigeren Temperaturen verschieben und in den meisten Fällen mit dem Schmelzpeak überlappen. Außerdem ist der Einfluss des Cholesterylmyristat-Zersetzungsproduktes auf den Schmelzvorgang unbekannt. Trotzdem kann ein Trend hinsichtlich einer abnehmenden Rekristallisationstendenz mit zunehmenden MPEG₂₀₀₀-DSPE-Gehalt (wie auch in Abschnitt 4.1.4 beschrieben) und einer leicht gestiegenen Rekristallisation nach 6 Monaten Lagerung in NaGC-haltigen Proben gegenüber entsprechenden Proben ohne NaGC beobachtet werden.

A2 Zusätzliche Partikelgrößendaten

Tabelle A.1: *Z-Average*-Durchmesser und Polydispersitätsindex (PDI) der für die DSC-Untersuchungen in Abschnitt 4.2.4 (Abbildung 4.14) verwendeten Dispersionen nach der Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung.

Probe	Z-Average [nm]		PDI	
	0 Monate	6 Monate	0 Monate	6 Monate
S100	132,8 ± 0,4	149,6 ± 1,3	0,108 ± 0,006	0,171 ± 0,047
S100-2 mol% MPEG-DSPE	90,9 ± 0,5	87,7 ± 0,4	0,219 ± 0,004	0,169 ± 0,008
S100-6 mol% MPEG-DSPE	155,3 ± 4,9	137,0 ± 0,5	0,244 ± 0,002	0,207 ± 0,006
S100/NaGC	145,3 ± 0,2	274,0 ± 0,6	0,188 ± 0,002	0,189 ± 0,009
S100/NaGC-2 mol% MPEG-DSPE	135,2 ± 0,1	133,6 ± 0,4	0,160 ± 0,006	0,180 ± 0,006
S100/NaGC-6 mol% MPEG-DSPE	134,5 ± 0,7	131,2 ± 0,3	0,176 ± 0,007	0,194 ± 0,007
S75	163,5 ± 1,0	172,0 ± 0,6	0,194 ± 0,004	0,203 ± 0,006
S75-2 mol% MPEG-DSPE	143,6 ± 0,4	132,5 ± 1,9	0,227 ± 0,002	0,190 ± 0,002
S75-6 mol% MPEG-DSPE	142,2 ± 0,8	123,9 ± 0,7	0,246 ± 0,001	0,205 ± 0,006

Tabelle A.2: *Z-Average*-Durchmesser und Polydispersitätsindex (PCS) der für die DSC-Untersuchungen in Abschnitt 4.2.4 (Abbildung 4.15) verwendeten Dispersionen nach der Herstellung und nach 3 oder 6 Monaten Lagerung.

Probe	Z-Average [nm]	PdI
S100_0 Monate	172,5 ± 0,2	0,132 ± 0,007
S100_3 Monate	174,4 ± 0,7	0,136 ± 0,014
S100_3 Monate_40 °C	171,7 ± 0,4	0,112 ± 0,014
S100-2 mol% MPEG-DSPE_0 Monate	119,8 ± 0,2	0,216 ± 0,007
S100-2 mol% MPEG-DSPE_3 Monate	120,4 ± 0,6	0,207 ± 0,001
S100-2 mol% MPEG-DSPE_3 Monate_40 °C	115,6 ± 0,5	0,194 ± 0,006
S100-2 mol% MPEG-DSPE_PP_0 Monate	110,4 ± 0,6	0,163 ± 0,007
S100-2 mol% MPEG-DSPE_PP_3 Monate	117,4 ± 0,5	0,153 ± 0,007
S100-2 mol% MPEG-DSPE_PP_3 Monate_40 °C	136,5 ± 0,7	0,119 ± 0,007
S100/NaGC/Ölsäure_0 Monate	142,4 ± 0,5	0,179 ± 0,003
S75-2 mol% MPEG-DSPE_TRIS_0 Monate	140,3 ± 0,6	0,163 ± 0,003
S75-2 mol% MPEG-DSPE_TRIS_6 Monate	139,4 ± 0,3	0,181 ± 0,003
S75_TRIS_0 Monate	149,0 ± 0,3	0,136 ± 0,007
S75_TRIS_6 Monate	163,5 ± 0,5	0,170 ± 0,004